

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ERIKA CRISTINA ZAGO

SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS EMPREGANDO LIPASES DE *Rhizopus*
microsporus PRODUZIDAS POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

CURITIBA

2010

ERIKA CRISTINA ZAGO

**SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS EMPREGANDO LIPASES DE *Rhizopus*
microsporus PRODUZIDAS POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Química - Área de Concentração: Química Orgânica do Curso de Pós Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Nadia Krieger

CURITIBA

2010

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

Aos meus pais, Isabel e Eduardo,
pelo suporte e apoio.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Isabel e Eduardo, pelo incentivo desde o “Pés no chão” e apoio durante todo o processo do mestrado, especialmente no final dele.

Ao meu querido e amado namorado Fábio, por ter dividido comigo todas as vitórias e “perrengues” de nossos mestrados. Obrigada também pelas idéias e por compartilhar sua mente brilhante comigo. Você é meu químico favorito!

Às minhas queridas amigas Monique, Milena e Desi, por terem ouvido meus desabafos e por terem me feito sentir menos sozinha a quase 8000 km de distância, quando eu tive que conviver com as “cucarachas”. Obrigada também por todos os momentos maravilhosos, dentre eles o inesquecível show do Guns, e, acima de tudo, por me compreenderem melhor que ninguém. Amo vocês!

Aos amigos do departamento de química (UFPR), Kelly, Guilherme Machado, Guilherme Purcote, Mayara, Marina, Enio, Andréia, Murilo, Juliana, Ana Cursino, Ana Pitarelo, Fabiano, Swami, Loraine (minha cunhada), Têre (cunhada 2), Diogo, Rafael (Janjão), Sérgio (Foz), Agne, Pati, Dani (Bubbles).

Aos amigos e colegas do LTEB, Dayane, Thaís, Arquimedes, Doumit, Kátia, Joel, Malu, Marcelo, Virgínia, Alysson (Café), Rodrigo Sodatti, Rodrigo Simas, Vivian, Chrishelen, Alessandra, Aline, Christiane, Juliane, Edgard, Viviane, Arnaldo, Lídia, Paola, Juliana, Bianca, Alexandra.

À minha orientadora, desde a iniciação científica, professora Nadia Krieger.

Aos professores das bancas de qualificação e defesa do mestrado, Brás Heleno de Oliveira, Gisella Maria Zanin, Luiz Pereira Ramos e à professora Sônia Faria Zavadzki, pela atenção e carinho.

Aos queridos professores do departamento de química da UFPR, Alfredo, Joaquim, Jaísa, Sueli, Iara, Claudiney, Ana Luiza, Bia, Joanez.

Ao pessoal do LACAUT, professor Carlos Yamamoto, Mitsuka e especialmente à Lílian Côcco, pelas análises, atenção e carinho.

Ao pessoal do CIATEJ, especialmente à minha “hermanita” Ivanna, que me ajudou tanto no laboratório como pessoalmente em meu estágio no México (Nunca vou esquecer!). À professora Georgina Sandoval, professores Juan Carlo, Jorge e Jesús, Mariana, Adrianita, Adrianota, Rose, Jacobo, Lorena.

Ao PPGQ, pela oportunidade e à Capes, pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos os que fizeram parte dessa caminhada e me auxiliaram de alguma forma. Muito obrigada!

ESQUEMAS

ESQUEMA 1 – A: REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO; B: REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO.7

ESQUEMA 2 - REPRESENTAÇÃO DO MECANISMO DA REAÇÃO PROPOSTO PARA A TRANSESTERIFICAÇÃO VIA CATÁLISE ALCALINA.7

ESQUEMA 3 - REPRESENTAÇÃO DO MECANISMO DA REAÇÃO PROPOSTO PARA A TRANSESTERIFICAÇÃO VIA CATÁLISE ÁCIDA.8

ESQUEMA 4 – REAÇÃO DE HIDRÓLISE DE UMA TRIACILGLICERÍDEO CATALISADA POR LIPASE.10

ESQUEMA 5 - REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO DE SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA CATALISADA POR LIPASE.35

ESQUEMA 6 - REPRESENTAÇÃO DE REAÇÃO DE HIDRÓLISE DE UM TRIACILGLICERÍDEO CATALISADA POR LIPASE.42

ESQUEMA 7 - REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DO GLICEROL A FORMALDEÍDO COM FORMAÇÃO DO COMPLEXO COLORIMÉTRICO 3,5-1,4-DIIDROLUTIDINA (410 NM), PELO MÉTODO SOLONI-MODIFICADO (MOURA *et al.*, 1998).45

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DA ESTERIFICAÇÃO VIA ENZIMÁTICA EM UM SISTEMA HETEROGÊNEO.	10
FIGURA 2 – ESTRUTURA DA LIPASE DE <i>Rhizopus oryzae</i> NA PRESENÇA DE TRICAPRILINA (TC ₈).	11
FIGURA 3 – MECANISMO PROPOSTO PARA A REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO CATALISADA POR LIPASE.	18
FIGURA 4 - FOTO DO BIORREATOR DE LEITO FIXO UTILIZADO NAS REAÇÕES DE ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO. EM DESTAQUE, O LEITO DE REAÇÃO, COM O SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE <i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM.	40
FIGURA 5 - ESTRUTURA DO COMPLEXO FORMADO ENTRE O ÍON Cu ²⁺ E OS ÁCIDOS GRAXOS LIVRES EM SOLUÇÃO.....	43
FIGURA 6 - ESTABILIDADE DO SÓLIDO FERMENTADO (a _w = 0,55) CONTENDO A LIPASE DE <i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM ARMAZENADO A 4°C. A ATIVIDADE DE HIDRÓLISE FOI DETERMINADA PELO MÉTODO TITULOMÉTRICO; SUBSTRATO: TRICAPRILINA.	53
FIGURA 7 - CINÉTICA DA SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS, CATALISADA PELA LIPASE DE <i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM PRODUZIDA POR FES (54 U.g ⁻¹ DE SÓLIDO SECO, 1,0 g DE SÓLIDO FERMENTADO); RAZÃO MOLAR 1:5 (ÁCIDO:ÁLCOOL), 37°C EM <i>n</i> -HEPTANO.	57
FIGURA 8 – EFEITO DA RAZÃO MOLAR DOS SUBSTRATOS NA SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS POR ESTERIFICAÇÃO, EM <i>n</i> -HEPTANO, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE <i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07.	58
FIGURA 9 – EFEITOS DAS VARIÁVEIS PRINCIPAIS E SECUNDÁRIAS SOBRE AS RESPOSTAS DO DELINEAMENTO FATORIAL APLICADO À SÍNTESE DE ÉSTERES POR ESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE <i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07.	62
FIGURA 10 - EFEITO DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NO DELINEAMENTO FATORIAL 2 ³ NO RENDIMENTO DA SÍNTESE DOS ÉSTERES ETÍLICOS, POR ESTERIFICAÇÃO, UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE <i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM PRODUZIDA POR FES.	64
FIGURA 11 – COMPARAÇÃO ENTRE OS DOIS MÉTODOS DE ANÁLISE DE ÉSTERES PARA UMA MESMA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM <i>n</i> -HEPTANO, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE <i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM.	67
FIGURA 12 - EFEITO DA PRESENÇA DE CO-SOLVENTE NA SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS POR ESTERIFICAÇÃO, UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE <i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM PRODUZIDA POR FES.	68
FIGURA 13 - ATIVIDADE RESIDUAL DE HIDRÓLISE DA LIPASE DE <i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM PRODUZIDA POR FES (ATIVIDADE INICIAL = 91,02 U.g ⁻¹ DE SÓLIDO	

SECO, 1,00 g DE SÓLIDO FERMENTADO) FRENTE A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ETANOL NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MILHO.70

FIGURA 14 - EFEITO DO CO-SOLVENTE NA ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM.72

FIGURA 15 – EFEITO DA RAZÃO MOLAR DOS SUBSTRATOS NA ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO EM *n*-HEPTANO, CATALISADAS PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM.74

FIGURA 16 – EFEITOS DAS VARIÁVEIS PRINCIPAIS E SECUNDÁRIAS SOBRE AS RESPOSTAS DO DELINEAMENTO FATORIAL APLICADO À SÍNTESE DE ÉSTERES POR TRANSESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM.78

FIGURA 17 - INTERPRETAÇÃO GEOMÉTRICA DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS INVESTIGADAS NO DELINEAMENTO FATORIAL 2^3 PARA O RENDIMENTO DA REAÇÃO DE ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM.79

FIGURA 18 - EFEITO DA ADIÇÃO DO ETANOL EM ETAPAS NAS REAÇÕES DE ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM.84

FIGURA 19 – EFEITO DA ADIÇÃO DO ETANOL EM ETAPAS NA REAÇÃO DE ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM.85

FIGURA 20 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE *N*-HEPTANO NO RENDIMENTO DA REAÇÃO DE ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM.87

FIGURA 21 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE CO-SOLVENTE NA REAÇÃO DE ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM.88

FIGURA 22 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE CO-SOLVENTE NA MASSA DE ÉSTER PRODUZIDO DURANTE A REAÇÃO DE ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM.90

FIGURA 23 – EFEITO DA ADIÇÃO DE ÁGUA NAS REAÇÕES DE ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO NO MEIO LIVRE DO CO-SOLVENTE, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM.91

FIGURA 24 – EFEITO DA ADIÇÃO DE ÁGUA NAS REAÇÕES DE ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO COM DIFERENTES PORCENTAGENS DO CO-SOLVENTE, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM.92

FIGURA 25 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE CO-SOLVENTE NA REAÇÃO DE ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO EM BIORREATOR DE LEITO FIXO, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM.94

FIGURA 26 – CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA DAS ALÍQUOTAS COLETADAS NAS PRIMEIRAS HORAS DE REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO EM BIORREATOR DE LEITO FIXO.95

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - UMA SELEÇÃO DE ESTUDOS RECENTES SOBRE A PRODUÇÃO DE BIODIESEL EM PROCESSOS DE ESTERIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES E TRANSESTERIFICAÇÃO DE ÓLEOS E GORDURAS UTILIZANDO LIPASES.	20
TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS ÓLEOS DE MILHO UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO.	50
TABELA 3 - COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS DOS ÓLEOS DE MILHO UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO.	51
TABELA 4 - PERFIL DE ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DA LIPASE DE <i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM CONTIDA NO SÓLIDO FERMENTADO.	52
TABELA 5 - ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DA LIPASE DE <i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM NAS DIFERENTES FRAÇÕES DO SÓLIDO FERMENTADO.....	54
TABELA 6 - EFEITO DA MOAGEM DOS SUBSTRATOS NA ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DA LIPASE DE <i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM NO SÓLIDO FERMENTADO.	55
TABELA 7 - EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE HIDROLÍTICA DA LIPASE DE <i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM CONTIDA NO SÓLIDO FERMENTADO.	56
TABELA 8 - DELINEAMENTO FATORIAL 2 ³ APLICADO NO ESTUDO DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO UTILIZANDO A LIPASE DE <i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM CONTIDA NO SÓLIDO FERMENTADO: VARIÁVEIS, NÍVEIS, E RESULTADOS EXPERIMENTAIS.	60
TABELA 9 - VALORES DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS PRINCIPAIS E SECUNDÁRIAS DO DELINEAMENTO FATORIAL SOBRE AS VARIÁVEIS-RESPOSTA (PORCENTAGEM DE CONVERSÃO EM ÉSTER E ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO) DA SÍNTESE CATALISADA PELA LIPASE DE <i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM CONTIDA NO SÓLIDO FERMENTADO.	61
TABELA 10 - ESTUDOS DE SÍNTESE DE ÉSTERES POR ESTERIFICAÇÃO CATALISADA POR LIPASES.	66
TABELA 11 - RESULTADOS EXPERIMENTAIS DO DELINEAMENTO FATORIAL 2 ³ APLICADO NO ESTUDO DA REAÇÃO DE ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO, UTILIZANDO A LIPASE DE <i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM CONTIDA NO SÓLIDO FERMENTADO LIOFILIZADO.	76
TABELA 12 - VALORES DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS PRINCIPAIS E SECUNDÁRIAS DO DELINEAMENTO FATORIAL, CALCULADOS A PARTIR DOS RESULTADOS DA TABELA 12.	77
TABELA 13 - ESTUDOS DE SÍNTESE DE ÉSTERES POR TRANSESTERIFICAÇÃO CATALISADA POR LIPASE.	80

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

a_w	Atividade de água
AGL	Ácidos graxos livres
AOCS	<i>American Oil Chemists' Society</i>
AOAC	<i>Association of Analytical Communities</i>
b^2	Número total de experimentos
C	Concentração
CCD	Cromatografia em camada delgada
CEPPA	Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos
CG	Cromatógrafo de fase Gasosa
CIATEJ	Centro de Pesquisa e Assistência Tecnológica do Estado de Jalisco
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
DAG	Diacylglicerídeo
EP	Efeitos Principais
FES	Fermentação em Estado Sólido
FID	<i>Flame Ionization Detector</i>
FS	Fermentação submersa
LACAUT	Laboratório de Análise de Combustíveis Automotivos
LTEB	Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise
m	Massa
MAG	Monoacylglicerídeo
M. M.	Massa molar
mM_{totais}	Concentração em milimols totais
p_0	Pressão de vapor da água pura
p_s	Pressão de vapor da água
p.p.	Pontos percentuais
RM	Razão Molar
T	Temperatura
TAG	Triacylglicerídeo
U	Unidades enzimáticas totais
V	Volume
y^+	Níveis máximos dos parâmetros
y^-	Níveis mínimos dos parâmetros

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS COMO COMPONENTES DO BIODIESEL.....	5
2.2 LIPASES.....	9
2.3 PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES).....	12
2.3.1 Lipases de <i>Rhizopus sp.</i>	15
2.3.2 Imobilização de lipases.....	15
2.3.3 Atividade de água (a_w) do sólido fermentado.....	17
2.4 LIPASES NA BIOSÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS DE BIODIESEL.....	17
2.4.1 Sistemas Reacionais utilizados em biocatálise.....	22
2.4.2 Variáveis e condições que podem afetar o processo biocatalisado.....	23
2.4.2.1 Efeito da concentração dos substratos.....	23
2.4.2.2 Efeito da temperatura.....	24
2.4.2.3 Efeito da água.....	25
2.4.2.4 Efeito da concentração do álcool.....	26
2.4.2.5 Efeito do co-solvente.....	27
3. OBJETIVOS.....	28
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1 PRODUÇÃO DA LIPASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES).....	30
4.1.1 Microrganismo.....	30
4.1.2 Manutenção do microrganismo e preparo do inóculo.....	30
4.1.3 Caracterização dos substratos utilizados no cultivo do microrganismo.....	30
4.1.4 Preparo do substrato para os cultivos.....	31
4.1.5 Cultivo de Fermentação em Estado Sólido (FES)	31
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO.....	32
4.2.1 Determinação da atividade lipolítica pela hidrólise dos triacilglicerídeos.....	32
4.2.2 Efeito do tamanho das partículas do sólido na fermentação e na atividade lipolítica.....	32
4.2.3 Estabilidade da lipase frente ao etanol em presença dos substratos da reação de transesterificação.....	33

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE MILHO UTILIZADO NAS REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO.....	33
4.3.1 Caracterização físico-química.....	33
4.3.1 Perfil de ácidos graxos das amostras de óleo de milho por derivatização e análise em CG.....	34
4.4 SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS POR ESTERIFICAÇÃO EM FRASCOS AGITADOS.....	34
4.4.1 Ensaios preliminares.....	34
4.4.2 Otimização da síntese de ésteres etílicos por esterificação.....	35
4.4.3 Efeito da concentração dos substratos e da presença de co-solvente no rendimento da reação.....	36
4.5 REAÇÕES DE ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO.....	37
4.5.1 Transesterificação em frascos agitados.....	37
4.5.1.1 Efeito da presença de co-solvente no rendimento da reação.....	37
4.5.1.2 Efeito da adição do etanol em etapas.....	38
4.5.1.3 Efeito da adição de água no rendimento da reação.....	38
4.5.2 Transesterificação em biorreator de leito fixo.....	39
4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	41
4.6.1 Dosagem de atividade lipolítica (Hidrólise).....	41
4.6.2 Método de Lowry-Tinsley.....	42
4.6.3 Determinação de ácidos graxos livres (% AGL).....	43
4.6.4 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	44
4.6.5 Dosagem de Glicerol.....	44
4.6.5.1 Método de Soloni modificado.....	44
4.6.5.2 Cromatografia de fase gasosa.....	45
4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS INSTRUMENTAIS.....	46
4.7.1 Caracterização do óleo de milho.....	46
4.7.1.1 Perfil de ácidos graxos das amostras de óleo de milho por derivatização e análise em CG.....	46
4.7.1.2 Análise de amostras provenientes de reações de transesterificação por Cromatografia de Fase Gasosa.....	47
4.7.1.2.1 Quantificação do teor de éster nas amostras por padronização externa.....	47
4.7.1.2.2 Quantificação do teor de éster nas amostras por padronização interna.....	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE MILHO UTILIZADO NAS REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO.....	50
5.1.1 Caracterização físico-química.....	50
5.1.2 Determinação da composição em ácidos graxos.....	51
5.2 CARACTERIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO.....	52
5.2.1 Atividade de hidrólise.....	52
5.2.2 Estabilidade do sólido fermentado ao armazenamento.....	53
5.2.3 Efeito do tamanho das partículas do sólido na fermentação.....	54
5.2.4 Efeito do tamanho das partículas do bagaço de cana antes dos cultivos.....	55
5.2.5 Efeito da temperatura.....	56
5.3 OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS POR REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO.....	57
5.3.1 Estudos preliminares.....	57
5.3.2 Efeito da razão molar dos substratos.....	58
5.3.3 Otimização das condições de síntese por delineamento fatorial.....	59
5.3.3.1 Variável-resposta: Atividade de esterificação (U/gSS).....	62
5.3.3.2 Variável-resposta: Conversão em Éster (%).....	63
5.3.4 Validação dos resultados de síntese por CG.....	67
5.3.5 Efeito da presença do co-solvente no rendimento da reação.....	68
5.4 OTIMIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO.....	69
5.4.1 Transesterificação em fracos agitados.....	69
5.4.1.1 Estudos preliminares.....	69
5.4.1.1.1 Estabilidade da lipase frente ao etanol em presença dos substratos.....	70
5.4.1.1.2 Efeito do co-solvente.....	71
5.4.1.1.3 Efeito da razão molar.....	73
5.4.1.2 Otimização das condições de etanólise do óleo de milho por delineamento fatorial.....	75
5.4.1.3 Efeito da adição do etanol em etapas.....	82
5.4.1.4 Efeito da presença do co-solvente no rendimento da reação.....	86
5.4.1.5 Efeito da adição de água no rendimento da reação.....	90
5.4.2 Transesterificação em biorreator de leito fixo.....	93
5.4.3 Dosagem de glicerol no meio reacional e no sólido fermentado.....	96
6. CONCLUSÕES.....	98
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	100
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101

RESUMO

As reações de esterificação e transesterificação têm grande importância industrial, como na produção de ésteres de biodiesel. Com as desvantagens do processo químico, como a dificuldade de separação dos produtos e a necessidade da utilização de elevados níveis de energia na reação, nos últimos anos aumentou significativamente o interesse pelo processo biocatalítico utilizando lipases. Dentro deste contexto, o presente trabalho tem por objetivo o estudo e a otimização do processo da síntese enzimática de ésteres etílicos, com enfoque nos ésteres que compõem o biodiesel, utilizando a lipase de *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM produzida por fermentação no estado sólido (FES). Foram realizados ensaios para o estudo do efeito da temperatura, razão molar dos substratos e quantidade de unidades enzimáticas totais adicionadas ao meio, nas reações de síntese de ésteres etílicos por esterificação e na etanólise do óleo de milho (em meio de cossolvente), através de um delineamento fatorial 2^3 , com triplicata no ponto central. O desvio padrão foi de $\pm 1,91$ p.p. para os ensaios de esterificação e $\pm 1,15$ p.p. para transesterificação. A reação otimizada de esterificação, atingiu uma conversão superior a 98%, em 3 h, produzindo 76 mg de éster/h.g_{catalisador}. Para a etanólise do óleo de milho, obteve-se uma conversão de 91% em 48 h (15 mg de éster/h.g_{catalisador}), nas condições ótimas. Utilizando as condições otimizadas pelos dois delineamentos, foi possível estudar o efeito da redução do cossolvente no meio reacional para ambas as reações. No caso da esterificação, em 3 h, foi obtida uma conversão de 68% para o meio com redução de 32% (v/v) na concentração de *n*-heptano e, 43% para o meio livre de cossolvente, correspondentes a uma produtividade em éster de 300 e 350 mg/h.g_{catalisador}, respectivamente. Na etanólise do óleo de milho, foram estudados dois parâmetros: a adição do etanol em etapas e a adição de água ao meio reacional. Com a adição em etapas do etanol, foi possível reduzir a quantidade de cossolvente em 30% (v/v), o que forneceu uma conversão de 90% em 120 h (26 mg/h.g_{catalisador}). Com a eliminação do cossolvente, a conversão foi de 54% em 120 h (38 mg/h.g_{catalisador}), demonstrando a capacidade da lipase de *R. microsporus* em catalisar a reação mesmo em concentrações elevadas de substratos. A adição de água ao meio reacional foi prejudicial à reação, para o meio com adição de água a produtividade foi metade (19 mg/h.g_{catalisador}) daquela obtida sem água adicionada ao meio (38 mg/h.g_{catalisador}). O ensaio de transesterificação em biorreator de leito fixo apresentou maior produtividade (50 mg/h.g_{catalisador}) em relação à reação que utilizou mesmos parâmetros, porém, em frascos agitados (32 mg/h.g_{catalisador}).

Palavras-chave: Ésteres etílicos, biodiesel, óleo de milho, *Rhizopus microsporus*, fermentação no estado sólido.

ABSTRACT

Esterification and transesterification reactions are used industrially for the production of esters of biodiesel. With the disadvantages of the chemical process, such as the difficulty of separating the products and the need to use high levels of energy in the reaction, in recent years there has been a significant interest in the biocatalytic process using lipases. Within this context, this paper aims to optimize the enzymatic synthesis of ethyl esters, with a focus on esters that compose biodiesel, using the lipase of *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM produced by solid state fermentation. Tests were conducted to study the effects of temperature, molar ratio of substrates and the total amount of enzyme added to the reaction medium, on two reactions, namely synthesis of ethyl esters by esterification and the ethanolysis of corn oil (in co-solvent medium). In both cases, a 2^3 factorial design was used, with a triplicate at the centre point. The standard error at this centre point was ± 1.91 p.p. in the case of esterification and ± 1.15 p.p. in the case of transesterification. The optimized esterification reaction reached a conversion of over 98% at 3 h, giving 76 mg of ester/h.g_{catalyst}, under the optimum conditions. For the ethanolysis of corn oil, a conversion of 91% was obtained at 48 h (15 mg of ester/h.g_{catalyst}), under optimized conditions. Using the optimized conditions for each factorial design, we then studied the effect of reducing the co-solvent in the reaction medium for each reaction. In the case of the synthesis of ethyl oleate, it was possible to reduce the concentration of co-solvent in the medium by 32% (v/v) and still obtain 68% (300 mg of ester/h.g_{catalyst}) in 3 h. At this time the conversion was 43% for the solvent-free medium, corresponding to a yield of 350 mg of ester/h.g_{catalyst}. In the case of ethanolysis of corn oil, two strategies were studied: stepwise addition of ethanol and the addition of water to the reaction medium. With the stepwise addition of ethanol, when the amount of co-solvent was reduced by 30% (v/v), a conversion of 90% was achieved in 120 h (26 mg of ester/h.g_{catalyst}). At the same time the conversion was 54% (38 mg of ester/h.g_{catalyst}) in the co-solvent-free system, demonstrating the ability of the lipase of *R. microsporus* to catalyze the reaction even in high concentration of substrates. Adding water to the reaction medium was detrimental to the reaction: in the absence of co-solvent, the maximum conversion obtained in the medium with the addition of water was half (19 mg/h.g_{catalyst}) of that obtained without the addition of water (38 mg/h.g_{catalyst}). The test of transesterification in fixed-bed bioreactor showed higher productivity (50 mg/h.g_{catalyst}) in relation to the reaction that used the same parameters, but in flask reaction (32 mg/h.g_{catalyst}).

Keywords: Ethyl esters, biodiesel, corn oil, *Rhizopus microsporus*, solid state fermentation.

1. INTRODUÇÃO

As reações de esterificação e transesterificação têm grande importância industrial, na produção de sabores e aromas, por esterificação, e atualmente para a produção de ésteres de biodiesel. Estas reações normalmente são realizadas utilizando processos químicos. Dentre os vários processos até agora propostos, catalisadores químicos (incluindo os alcalinos) têm sido bastante empregados, uma vez que eles dão uma alta conversão em ésteres em um curto tempo. No entanto, os processos químicos têm várias desvantagens, incluindo a dificuldade de reciclagem do glicerol, o grau de pureza dos produtos devido à necessidade de eliminar o catalisador e o sal formado, bem como o alto grau de energia necessário para essas reações. Devido a isto, novas alternativas de síntese de ésteres, particularmente os ésteres do biodiesel, vêm sendo estudadas.

Em processos enzimáticos de produção do biodiesel, entre outras, cita-se a vantagem de utilização de materiais de partida de baixo custo, como os resíduos de fritura e borras ácidas (derivados da indústria de refino de óleos), que, devido ao seu alto teor de ácidos graxos livres, são inadequados para alguns processos químicos, especialmente aqueles que envolvem catalisadores alcalinos. Outras vantagens da utilização de lipases e enzimas de modo geral são a sua elevada especificidade, a diminuição de riscos para a saúde, e os baixos níveis de ocorrência de reações laterais e as condições reacionais brandas do processo enzimático, que permitem um menor consumo energético e evitam a degradação ou decomposição de produtos e reagentes. Em adição a estas vantagens, existem alguns problemas práticos relacionados ao seu uso, como o alto custo de isolamento e purificação das enzimas de interesse, a instabilidade da sua estrutura uma vez isolada do meio natural (aquoso), e sua sensibilidade às condições reacionais. A produção de lipases microbianas para utilização em reações de esterificação e transesterificação tem sido feita geralmente por fermentação submersa (FS). Entretanto, este processo de produção é caro, pois exige a concentração do meio de cultura, e quase sempre a imobilização da enzima, pois assim pode-se facilmente recuperá-la e reutilizá-la. Desta forma, a produção de lipases por fermentação em estado sólido (FES) apresenta-se como uma possibilidade interessante, uma vez que, nele, a enzima é produzida e encontra-se imobilizada naturalmente sobre o suporte. Em sistemas de FES o organismo cresce em partículas sólidas de um material orgânico úmido, com um mínimo de água livre nos espaços entre as partículas. O sólido fermentado pode, portanto atuar como um suporte para a enzima, sem a necessidade de uma etapa prévia de extração.

As lipases podem apresentar altos níveis de atividade e estabilidade em meios não-aquosos, ou seja, em meios que envolvem um solvente orgânico (cossolvente). Os meios que envolvem um cossolvente têm sido muito utilizados em reações de síntese pois apresentam vantagens em relação aos meios aquosos, como a facilidade de trabalhar em sistemas fechados, devido ao baixo ponto de ebulição da maioria dos solventes, a possibilidade de solubilização de substratos hidrofóbicos, o deslocamento do equilíbrio termodinâmico a favor das reações de síntese, a redução da possibilidade de reações laterais causadas pela água e a proteção contra contaminação microbiana. Apesar dessas vantagens, a utilização de lipases para síntese em meios livres de cossolventes apresenta a vantagem de maximização da concentração dos substratos, evitando-se o custo do solvente inerte e de sua remoção no final da reação, o que torna estes processos mais econômicos e menos impactantes para o meio ambiente.

Quando se estudam reações em meios não aquosos, apesar de o meio reacional conter principalmente solvente orgânico e os substratos, alguma quantidade de água é necessária para manter a enzima ativa. As moléculas de água são essenciais porque elas promovem interações que permitem o dobramento da proteína em sua estrutura tridimensional nativa, cataliticamente ativa. Além da enzima, a quantidade de água requerida para a máxima atividade depende também da polaridade do solvente utilizado: quanto mais hidrofílico for o solvente, mais água será necessária para atingir a atividade ótima. Isto indica que no caso dos solventes mais hidrofílicos, a enzima e o solvente competem pelas moléculas de água. Na esterificação este controle deve ser melhor acompanhado, uma vez que a água é um dos produtos desta reação.

Um grande problema das reações envolvendo lipases e alcoóis de cadeia curta, como metanol e etanol, é que esses alcoóis podem agir como inibidores de enzimas, diminuindo sua atividade. Uma alternativa, para minimizar esse efeito, seria a adição parcial do álcool durante a reação de síntese, reduzindo a possibilidade de desnaturação da enzima por desidratação.

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve por objetivo o estudo e a otimização do processo da síntese enzimática de ésteres etílicos, com enfoque nos ésteres que compõem o biodiesel, utilizando o sólido fermentado contendo a lipase de *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM produzido por fermentação no estado sólido (FES).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS COMO COMPONENTES DO BIODIESEL

Nos últimos anos, o mundo tem sido confrontado com uma crise energética, com exceção da hidroeletricidade e energia nuclear, pois a maior parte da energia consumida em todo o mundo é de fontes não renováveis como petróleo, carvão e gás natural. O petróleo está se tornando escasso e seu uso está associado à geração de problemas ambientais. Devido ao aumento do preço do petróleo e às preocupações ambientais sobre poluição proveniente dos gases de automóveis, a busca por fontes alternativas de energia é de vital importância (SCHUCHARDT, SERCHELI e VARGAS, 1998). Assim sendo, a pesquisa na área de produção do biodiesel vem se desenvolvendo extensivamente. Uma das vantagens do biodiesel é que as matérias-primas utilizadas para produzi-lo são naturais e renováveis, tais como óleos vegetais ou gorduras animais.

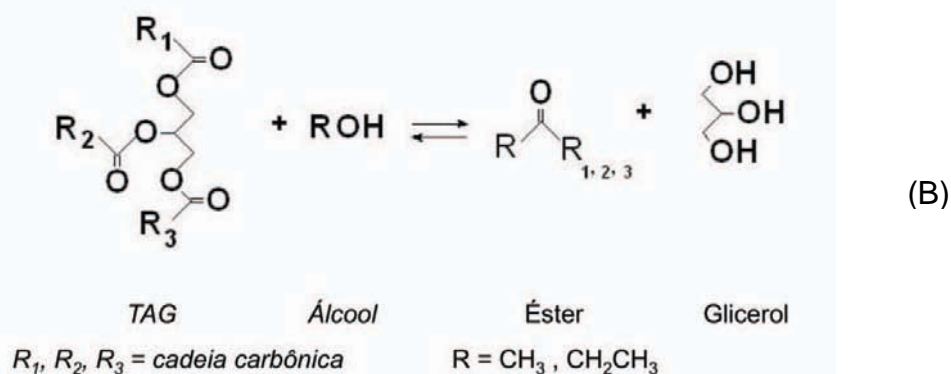
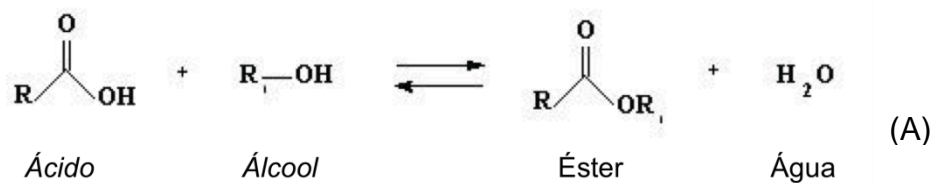
O nome biodiesel foi introduzido nos Estados Unidos em 1992, pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento do diesel de Soja (atualmente Conselho Nacional de Biodiesel), que foi pioneiro na comercialização de biodiesel nos Estados Unidos (SINGH e SINGH, 2010). O biodiesel pode ser utilizado em qualquer mistura com o diesel de petróleo, uma vez que tem características muito semelhantes, porém, menores emissões de gases de escape. Este combustível tem propriedades mais atraentes do que o diesel de petróleo, do ponto de vista ambiental e econômico, tais como a biodegradabilidade, a origem em fontes renováveis, a ausência de toxicidade, sendo essencialmente livre de enxofre e compostos aromáticos. Devido a isto, o combustível biodiesel tem potencial para reduzir o nível de poluentes e de substâncias cancerígenas potenciais ou prováveis (PEREIRA *et al.*, 2007; MA e HANNA, 1999).

Segundo a Lei Federal nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, biodiesel é um “biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil” (BRASIL, 2005). Por definição, o biodiesel é composto por ésteres alquílicos de ácidos graxos, obtidos pela transesterificação de óleos ou gorduras, de plantas ou animais, com álcoois de cadeia curta, como metanol e etanol (AKOH *et al.*, 2007). O biodiesel, devido ao fato de originar-se de fontes naturais e renováveis, reduz a emissão de gases poluentes no meio ambiente, pois o CO₂ produzido é reciclado pelos vegetais e, assim,

utilizado direta ou indiretamente na produção do biocombustível (JAEGER e EGGERT, 2002).

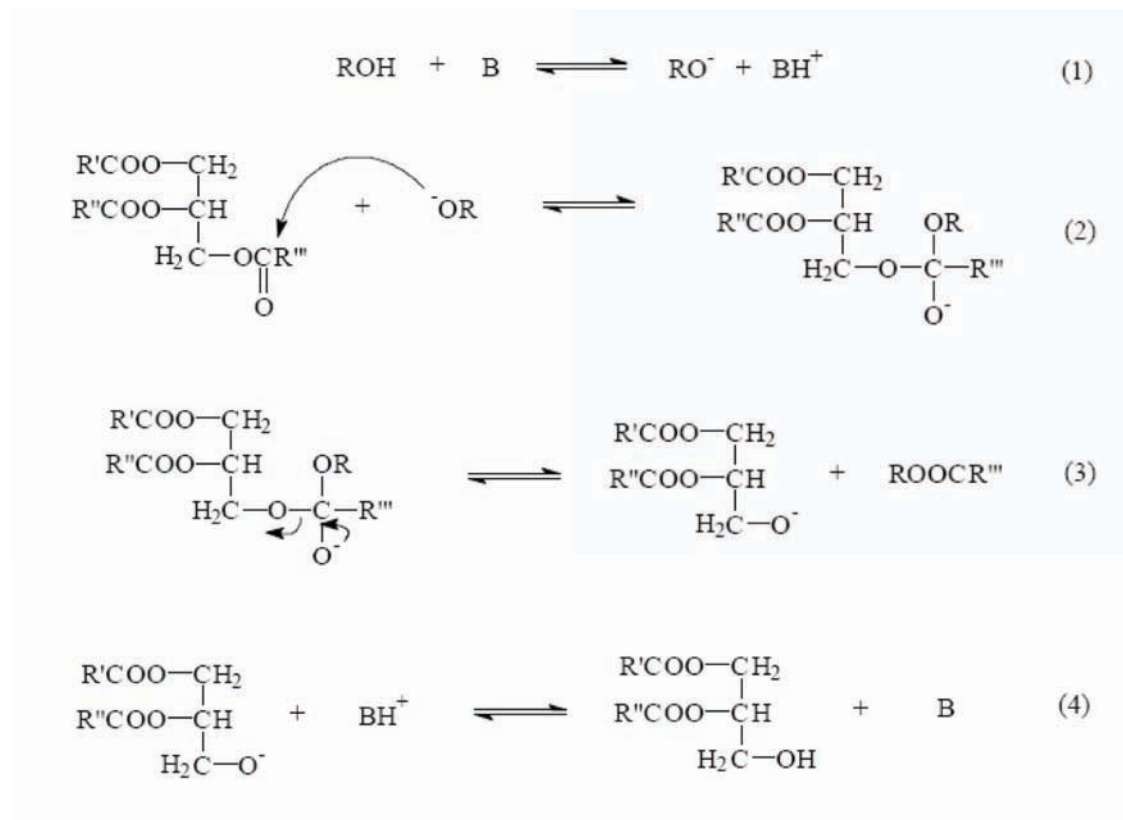
O biodiesel pode ser obtido por meio de processos de esterificação ou transesterificação (ESQUEMA 1), onde o objetivo principal do processo de transesterificação do óleo é reduzir sua viscosidade para um valor próximo ao do diesel (PEREIRA *et al.*, 2007). Sob condições de baixo teor de água, a reação no sentido da formação dos ésteres é favorecida. A principal diferença entre a esterificação de ácidos graxos livres e transesterificação de triacilglicerídeos (TAGs - óleos) é que, no primeiro caso, as ligações hidroxila são clivadas, enquanto que, no segundo caso, são clivadas as ligações éster. Esta reação se dá em três etapas: primeiramente são produzidos os intermediários diacilglicerídeos (DAGs), na sequência os monoacilglicerídeos (MAGs) e por último os ésteres alquílicos. Além disso, o subproduto da esterificação é a água, já na transesterificação, é o glicerol (AL-ZUHAIR, LIG e JUN, 2007). Geralmente, utiliza-se o metanol como reagente, pois este álcool é mais barato do que o etanol, mais reativo, por ser um álcool de cadeia curta, e por apresentar maior polaridade em relação ao etanol. Visto que o objetivo principal da alcoólise é a redução da viscosidade e aumento da volatilidade do óleo ou gordura, outra vantagem da utilização do metanol é o fato de que ésteres metílicos de ácidos graxos são mais voláteis quando comparados aos ésteres etílicos. Porém, no Brasil, o etanol da cana-de-açúcar tem um grande potencial como uma fonte de álcool, uma vez que pode aliar sua baixa toxicidade com a disponibilidade a partir de fontes renováveis.

A reação de transesterificação tem preferência em relação à esterificação direta de ácidos graxos porque TAGs são mais comumente disponíveis do que ácidos graxos livres (DOSSAT, COMBES e MARTY, 2002). Porém, os altos custos dos óleos vegetais em comparação ao óleo diesel, bem como a sua utilização como alimento, estimulam a busca por fontes economicamente mais acessíveis, como óleo de cozinha usado e resíduos indústrias (borras ácidas). Desta forma, o processo de síntese dos ésteres de biodiesel por esterificação pode ser vantajoso, pois, além da possibilidade de utilização de resíduos como fonte de ácidos graxos, este processo pode fornecer conversões altas em tempos reduzidos de reação. Nos processos industriais desenvolvidos atualmente para a produção de ésteres de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais, o catalisador é de origem química, sendo que os catalisadores alcalinos são os mais utilizados, porque os processos que usam este tipo de catalisador são mais eficientes e menos corrosivos do que os processos que usam ácidos (MARCHETTI, MIGUEL e ERRAZU, 2007). Desta forma, os catalisadores mais utilizados neste processo, são os alcóxidos de metais alcalinos, bem como carbonatos de sódio e potássio (SCHUCHARDT, SERCHELI e VARGAS, 1998).



ESQUEMA 1 – A: REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO; B: REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO.

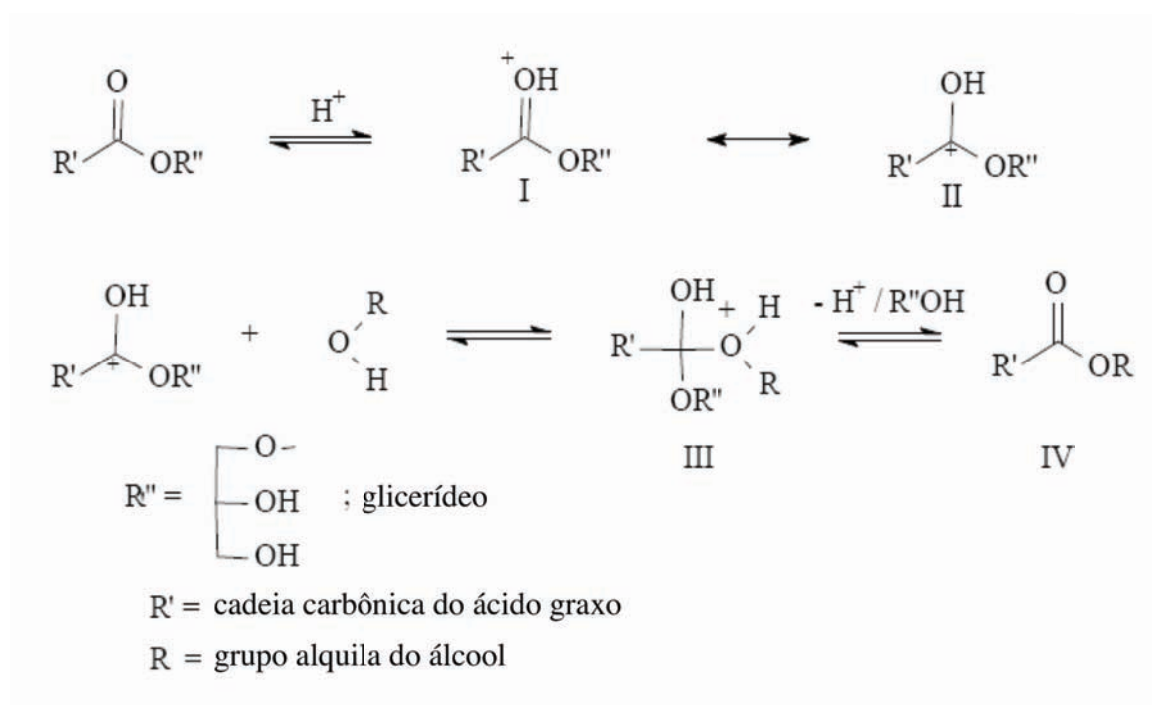
O Esquema 2 mostra o mecanismo da transesterificação de óleos vegetais via catálise alcalina.



ESQUEMA 2 - REPRESENTAÇÃO DO MECANISMO DA REAÇÃO PROPOSTO PARA A TRANSESTERIFICAÇÃO VIA CATÁLISE ALCALINA.
(FONTE: SCHUCHARDT, SERCHELI e VARGAS, 1998)

A primeira etapa (1) é a reação da base com o álcool, produzindo um íon alcóxido e o catalisador protonado. Na segunda etapa (2), é representado o ataque nucleofílico ao átomo de carbono da carbonila da molécula do triacilglicerídeo pelo ânion correspondente ao álcool (íon alcóxido), para formar um intermediário tetraédrico. Na etapa seguinte (3), o rearranjo do intermediário tetraédrico resulta na formação de um éster do ácido graxo e do ânion correspondente ao diacilglicerídeo. Na última etapa (4), com a espécie ativa desprotonada, ocorre a formação do diacilglicerídeo, que agora é capaz de reagir com uma segunda molécula de álcool, para iniciar outro ciclo catalítico. DAGs e MAGs são convertidos pelo mesmo mecanismo formando uma mistura de ésteres alquílicos e glicerol (SCHUCHARDT, SERCHELI e VARGAS, 1998).

No processo da catálise ácida, normalmente são empregados ácidos de Brønsted, preferencialmente ácido sulfúrico ou sulfônico (FREEDMAN, BUTTERFIELD e PRYDE, 1986). Estes catalisadores oferecem rendimentos elevados em ésteres alquílicos, porém, as reações são lentas e exigem altas temperaturas para ocorrerem, sendo reportadas reações com temperaturas acima de 100°C e mais de 3 h para chegar à conversão completa (SINGH e SINGH, 2010). No Esquema 3 está representado o mecanismo proposto para a reação de transesterificação utilizando um catalisador de origem ácida.



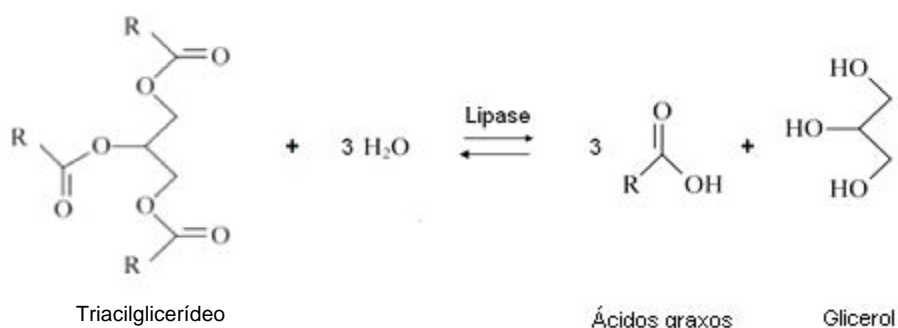
ESQUEMA 3 - REPRESENTAÇÃO DO MECANISMO DA REAÇÃO PROPOSTO PARA A TRANSESTERIFICAÇÃO VIA CATÁLISE ÁCIDA.
(FONTE: SCHUCHARDT, SERCHELI e VARGAS, 1998).

No caso da transesterificação ácida, ocorre a protonação do grupo carbonila do acilglicerídeo, levando à formação de um carbocátion, que, depois de um ataque nucleofílico do álcool, produz um intermediário tetraédrico. Esse intermediário elimina o glicerol para formar um novo éster e regenerar o catalisador (SINGH e SINGH, 2010; SCHUCHARDT, SERCHELI e VARGAS, 1998).

Entretanto, os processos que utilizam catalisadores de origem química têm várias desvantagens, incluindo a dificuldade de separação do glicerol, a necessidade de eliminar o catalisador e o sal formado, bem como altas temperaturas necessárias para essas reações, levando ao desenvolvimento de processos alternativos, dentre os quais, os processos biocatalíticos que utilizam lipases (HAMA *et al.*, 2007).

2.2 LIPASES

As lipases [glicerol éster hidrolases (E.C. 3.1.1.3)] são biocatalisadores extremamente versáteis e muito eficientes que têm uma posição de destaque em sistemas orgânicos com baixo teor de água, devido à gama de reações catalisadas nestes meios reacionais - esterificação, transesterificação, interesterificação e aminólise, à estabilidade apreciável nestes ambientes e à possibilidade de utilização de condições reacionais brandas (YIN, LIU e TAN, 2006; KIM, YOUN e SHIN, 2006; RASSY, PERRARD e PIERRE, 2004).



ESQUEMA 4 – REAÇÃO DE HIDRÓLISE DE UM TRIACILGLICERÍDEO CATALISADA POR LIPASE.

As lipases pertencem a um grupo especial de esterases classificadas como serina hidrolases, e são constituídas pela tríade catalítica Gly-X₁-Ser-X₂-Gly, onde Gly = glicina; Ser = Serina; X₁ = histidina e X₂ = ácido glutâmico ou aspártico (SAXENA *et al.*, 2003). A massa molar das lipases encontra-se normalmente entre 12 kDa (BANDMANN *et al.*, 2000) a 69 kDa (DHARMSTHITI e LUCHAI, 1999). Atuam sobre substratos insolúveis em água, em interfaces de lipídeo/água, hidrolisando, por exemplo, acilgliceróis de cadeia longa (acima de 8 átomos de carbono), seus substratos naturais, além de serem capazes de catalisarem reações de síntese, em ambiente aquo-restrito (BORNSCHEUER *et al.*, 2002). Na maioria das lipases, existe uma parte da molécula da enzima que cobre o sítio ativo com uma curta α -hélice, e é chamada “flap” ou “lid” (tampa). O lado da “tampa” voltado para o sítio catalítico, assim como as cadeias protéicas ao redor deste, são compostos principalmente por cadeias laterais hidrofóbicas. Em ambientes aquosos, sem o seu substrato natural, a “tampa” está cobrindo o sítio catalítico, a lipase é inativa, e diz-se que ela está na sua forma “fechada”. Na presença de substratos hidrofóbicos, as lipases são “adsorvidas” na interface hidrofóbica, o que promove mudanças dramáticas na estrutura enzimática, levando à forma “aberta” da lipase, deixando a enzima ativa. Esta mudança na estrutura tridimensional da lipase em interfaces água/óleo é conhecida como “ativação interfacial”. Descrito em 1936 por Holwerda *et al.*, este fenômeno se caracteriza por uma atividade muito maior da enzima em substratos pouco solúveis sob condições onde a área interfacial dos substratos é maior (emulsões de TAGs, por exemplo) (FIGURA 1).

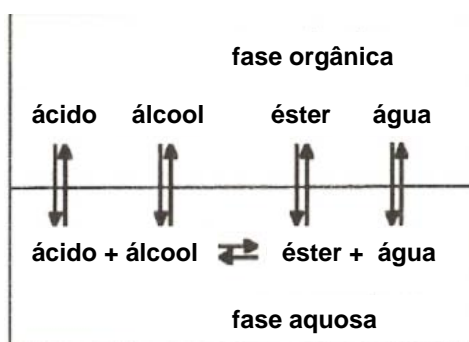


FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DA ESTERIFICAÇÃO VIA ENZIMÁTICA EM UM SISTEMA HETEROGÊNEO.
(FONTE: STRAATHOF e ADLERCEUTZ, 2000).

Com relação à estrutura de lipases, estudos de raio-X mostraram que a sua estrutura tridimensional apresenta um padrão conformacional comum, denominado de conformação α/β hidrolase, composto de uma sequência de α -hélices e folhas β -pregueadas (FIGURA 2) (JAEGER *et al.*, 1994).

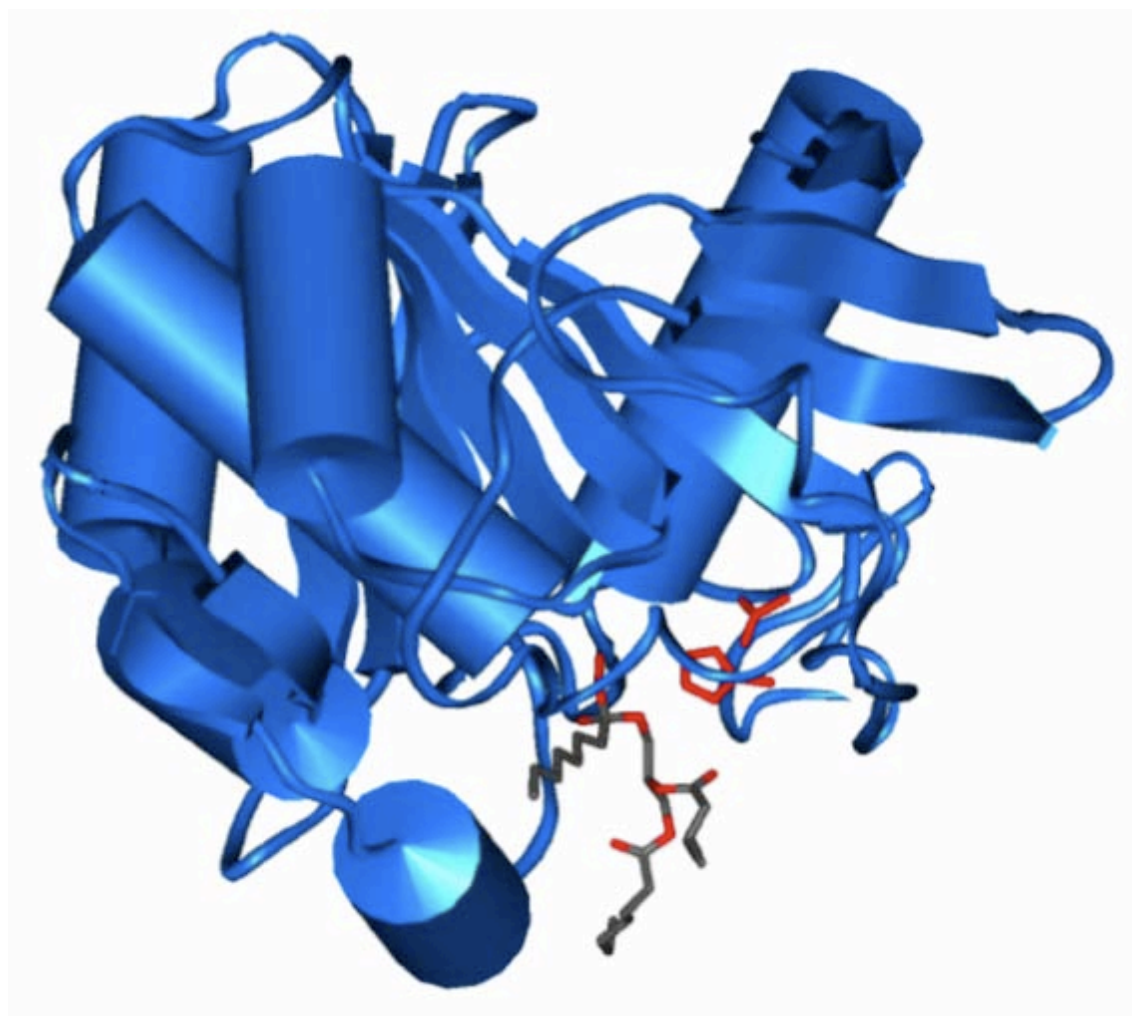


FIGURA 2 – ESTRUTURA DA LIPASE DE *Rhizopus oryzae* NA PRESENÇA DE TRICAPRILINA (TC_8).
(FONTE: DIAZ, 2005).

Lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais (estômago, tecido adiposo, vascular e linfático, lisossomos), vegetais (oleaginosas) e microbianas (bactérias e fungos), nas quais exercem um papel chave na modificação biológica de lipídios. A maioria das lipases utilizadas como catalisadores em síntese orgânica são de origem microbiana, como as lipases de *Candida rugosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus oryzae* (BAN *et al.*, 2001), *Burkholderia cepacia*

(SALUM *et al.*, 2008; FERNANDES *et al.*, 2007), *Aspergillus niger*, *Thermomyces lanuginosus*, e *Rhizomucor miehei* (AL-ZUHAIR, LIG e JUN, 2007). As razões para o enorme potencial biotecnológico de lipases microbianas incluem os fatos de que elas são (a) estáveis em solventes orgânicos, (b) não necessitam de co-fatores, (c) possuem uma grande especificidade ao substrato e (d) exibem uma alta enantioseletividade (REETZ e JAEGER, 1998), além de poderem ser produzidas em abundância por fermentação.

A importância tecnológica das lipases está bem documentada na literatura. Assim como outras classes de enzimas, as lipases vêm sendo aplicadas em diversas áreas devido às suas vantagens em comparação com catalisadores químicos: mostram alta seletividade, atuam em condições brandas e são biodegradáveis (FORESTI e FERREIRA, 2005). Considerando estas vantagens, as lipases estão entre os biocatalisadores mais utilizados na área de química orgânica (DIAZ *et al.*, 2006). Neste campo, lipases vêm sendo amplamente empregadas em diversas reações, como sínteses enantiosseletivas (LARISSEGGGER-SCHNELL *et al.*, 2006; MAJEWSKA, KAFARSKI e LEJCZAK, 2006), síntese de medicamentos (BEVILAQUA *et al.*, 2004; LOZANO *et al.*, 2004), síntese de ésteres de biodiesel (CHEN *et al.*, 2009; RIVERA, VILLANUEVA e SANDOVAL, 2009; QIN *et al.*, 2008; SALUM *et al.*, 2008; FERNANDES *et al.*, 2007) e acilação de flavonóides a fim de aumentar sua hidrofobicidade (ARDHAOUÏ *et al.*, 2004). Lipases também são empregadas em aplicações menos “nobres”, mas nem por isso menos importantes como na biorremediação de solos e efluentes para remoção de óleos presentes nas águas residuais de indústrias de refinação de óleos, fábricas de laticínios, restaurantes ou residências (ALBERTON *et al.*, 2010; PANDEY *et al.*, 1999; REETZ e JAEGER, 1998).

2.3 PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

Apesar de todas as vantagens relatadas sobre utilização de lipases, existem ainda problemas para serem resolvidos no desenvolvimento de processos de aplicações destas enzimas, principalmente do ponto de vista econômico, pois o custo de produção, purificação e imobilização das enzimas (quando requerida) torna os processos enzimáticos mais caros do que os processos químicos ou biológicos convencionais (como, por exemplo, no caso da produção do biodiesel). O presente trabalho aborda este problema, no contexto da produção de ésteres de biodiesel pela reação de transesterificação de óleos vegetais, utilizando a estratégia desenvolvida por Nagy *et al.* (2006), Fernandes *et al.* (2007) e Salum *et al.* (2010), ou seja, a produção de lipase por

fermentação em estado sólido (FES) e a adição direta do sólido fermentado para catalisar a reação desejada. Esta estratégia traz duas vantagens econômicas. Primeiro, a produção de lipases por FES envolve custos significativamente menores do que aqueles envolvidos na produção em fermentação submersa devido à simplicidade e economia do processo em termos de espaço, meio, equipamentos e energia (MITCHELL *et al.*, 2006; CASTILHO *et al.* 2000). Segundo, a adição direta do sólido fermentado evita as etapas de extração, recuperação e imobilização da enzima (SALUM *et al.*, 2010; FERNANDES *et al.*, 2007).

Castilho *et al.* (2000) realizaram uma análise econômica comparativa dos processos de fermentação submersa (FS) e FES para produção de lipases por *Penicillium restrictum* e, constataram que o preço do produto obtido por FES seria 47% menor do que o preço de mercado para uma lipase similar. Esses resultados evidenciam que a FES na produção de enzimas, nesse caso lipases, é altamente atrativo do ponto de vista econômico.

A FS tem como característica principal a utilização de um meio fermentativo líquido com nutrientes solúveis. Na FS, a quantidade de sólidos não ultrapassa 50 g.L⁻¹ (MITCHELL *et al.*, 2006; MITCHELL, BEROVIC e KRIEGER, 2002).

Na FES, o microrganismo cresce em substratos sólidos umedecidos ou suportes inertes, na ausência (ou quase) de água livre, com umidade suficiente para manter o crescimento de metabólitos e microrganismos (o conteúdo de sólidos varia de 20 a 70% do peso total). Os metabólitos são normalmente produzidos em uma forma concentrada, facilitando o seu processo de recuperação do meio de fermentação. Neste caso, o microrganismo pode crescer entre os fragmentos do substrato (dentro da matriz do substrato) ou sobre a superfície do substrato, consumindo o substrato e secretando metabólitos, dentre os quais as enzimas (MITCHELL *et al.*, 2006). O material sólido é insolúvel e age como suporte físico e como fonte de nutrientes. O material sólido poderá ser um substrato sólido natural, como resíduos agroindustriais, ou um suporte inerte, como poliuretano ou resinas poliméricas (HAMA *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2005; PANDEY, 2003).

Fungos termotolerantes podem ser cultivados tanto por fermentação submersa (FS) quanto por fermentação em estado sólido (FES). Estudos sobre uma variedade de enzimas, incluindo lipases fúngicas (CHRISTEN *et al.*, 1995), mostraram que a fermentação em estado sólido (FES) fornece um maior rendimento da enzima em comparação à FS. Esta vantagem foi atribuída ao aumento das taxas de crescimento de biomassa nesse meio e à menor atividade de protease que ocorre em culturas de FES quando comparadas à produção por FS (DIAZ *et al.*, 2006). A baixa disponibilidade de água na FES é mais adequada para o crescimento de fungos filamentosos do que para

bactérias e leveduras. Além disso, o crescimento das hifas confere ao fungo a habilidade em penetrar, via sistema mecânico e enzimático, nos substratos sólidos e, conseqüentemente, absorver nutrientes (MITCHELL, BEROVIC e KRIEGER, 2002; RAIMBAULT, 1998).

Resíduos agrícolas, tais como bagaço de cana-de-açúcar, são ricos em carbono e materiais celulósicos, portanto, podem ser utilizados como recursos renováveis para o crescimento de microrganismos e a produção de metabólitos (YANG e YUAN, 1990; YANG e SWEI, 1996). O bagaço de cana-de-açúcar é o resíduo da cana após a moagem e extração do caldo. O bagaço de cana é, sem dúvida, o resíduo agroindustrial obtido em maior quantidade no Brasil, (aproximadamente 280 kg.ton^{-1} de cana moída). Estima-se que a cada ano sejam produzidos de 5 a 12 milhões de toneladas desse material, correspondendo a cerca de 30% do total da cana moída. Devido à grande quantidade produzida e às suas características físicas e químicas, esse material encontra um vasto campo de utilização, dentre eles na produção de ração animal, na indústria química, na fabricação de papel, papelão e aglomerados, como material alternativo na construção civil, e na produção de biomassa microbiana (SANTOS, 2005).

Além da composição e da manutenção das características químicas, uma das mais importantes propriedades físicas do substrato para a eficiência do processo de FES é o tamanho de suas partículas. Partículas pequenas favorecem a compactação do sólido e, conseqüentemente, impede a difusão de gases no meio. Contrariamente, partículas grandes favorecem maior aeração, mas limitam a superfície de contato do substrato para o microrganismo. Portanto, o tamanho ideal da partícula deve representar um compromisso entre a acessibilidade dos nutrientes e a disponibilidade de oxigênio (MITCHELL *et al.*, 2006; MITCHELL, BEROVIC e KRIEGER, 2002; PANDEY *et al.*, 1999).

Diaz *et al.* (2006) estudaram a produção da lipase do fungo termotolerante *Rhizopus homothallicus* por FES (utilizando como suporte o bagaço de cana-de-açúcar e óleo de oliva em meio de saís como substrato) e FS (extrato do milho macerado, peptona e saís como substrato). A lipase produzida por FES apresentou atividade específica de 5200 U.mg^{-1} , enquanto que a lipase produzida por FS apresentou 4400 U.mg^{-1} . Neste trabalho também foram reportados os efeitos do pH e da temperatura na atividade da lipase produzida por FES e por FS. Ambas lipases apresentaram atividade máxima em pH 7,5, no entanto, a lipase produzida por FES apresentou uma atividade específica 23% mais alta do que aquela produzida por FS. Quanto à temperatura, a lipase produzida por FES se mostrou mais tolerante, sua atividade máxima foi obtida a 40°C , enquanto para aquela produzida por FS, a atividade máxima foi obtida a 30°C . Observou-se que a lipase de FS apresentou uma velocidade de inativação maior do que a lipase de FES, uma vez

que os tempos de meia-vida calculados para cada uma delas foram de 0,44 e 0,72 h, respectivamente.

Neste contexto, a utilização da lipase produzida por FES na síntese de ésteres, tendo como substrato o bagaço de cana-de-açúcar, apresenta-se como uma possibilidade interessante, particularmente se o próprio sólido fermentado contendo a enzima pode ser utilizado diretamente para catálise da reação, conforme descrito por Salum *et al.* (2010) e Fernandes *et al.* (2007).

2.3.1 Lipases de *Rhizopus sp*

Rhizopus é um gênero importante de fungos filamentosos que tem sua aplicação tanto no processo fermentativo de alimentos, como na produção industrial de enzimas (KITPREECHAVANICH *et al.*, 2008). O gênero *Rhizopus* é classificado quanto à sua morfologia e temperatura máxima de crescimento (SCHIPPER, 1984), e, de acordo com esta classificação, o fungo da espécie *R. microsporus*, utilizado neste trabalho, é classificado como termotolerante, pois cresce em temperaturas de 30 a 45°C (KITPREECHAVANICH *et al.*, 2008). Um fungo é considerado termotolerante quando sua temperatura de crescimento máximo é de cerca de 50°C, podendo se desenvolver também a 20°C (COONEY e EMERSON, 1964). As lipases dos fungos pertencentes ao gênero *Rhizopus* são mais ativas na faixa de pH entre 7,5 a 8,5 e nas temperaturas de 30 a 40°C. Os seus pontos isoelétricos (pI) variam de 7,1 a 8,6, são estáveis a temperaturas de 50°C e em valores de pH entre 4,5 e 8,0 (SUN, XU e WANG, 2009; DIAZ *et al.*, 2006; HIOL *et al.*, 2000; ESSAMRI, DEYRIS e COMEAU, 1998).

Para fins de desenvolvimento do processo desejado, é de especial importância que lipases e enzimas em geral possam ser reutilizadas e, portanto, que mostrem uma considerável estabilidade funcional. Isto pode ser atingido pelo processo de imobilização de enzimas sobre suportes, que será descrito a seguir.

2.3.2 Imobilização de lipases

Em adição às vantagens na utilização de enzimas como biocatalisadores, existem alguns problemas práticos relacionados ao seu uso, como o alto custo de isolamento e purificação das enzimas de interesse, a instabilidade da sua estrutura uma vez isolada do meio natural (aquoso), e sua sensibilidade às condições reacionais:

enzimas podem ser inibidas por substâncias que estão presentes no meio reacional, desnaturadas por solventes orgânicos ou por temperaturas relativamente elevadas. Muitos métodos têm sido propostos a fim de minimizar estes inconvenientes, sendo um deles a imobilização de enzimas (ILLANES, 2008).

Enzimas imobilizadas são aquelas que estão confinadas ou localizadas em um suporte apropriado que permite com que a enzima entre em contato com o substrato, catalisando as reações, mas que as tornem insolúveis (GIRELLI e MATTEI, 2005; PAIVA, BALCÃO e MALCATA, 2000). As pesquisas sobre este assunto intensificaram-se a partir dos anos 60, no sentido de estabelecer métodos eficientes de imobilização, quer por meios físicos, quer químicos, ou em suportes inertes insolúveis (VITOLO, 2001).

As principais vantagens da utilização de enzimas imobilizadas são a possibilidade de reutilização das enzimas, a facilidade de recuperação dos produtos, a maior facilidade de controle e de operação de processos e reatores, e a minimização da produção de efluentes. Além disso, muitas vezes com o processo de imobilização, as propriedades enzimáticas são alteradas, produzindo biocatalisadores com atividade, especificidade e estabilidade aumentadas, dependendo do tipo de imobilização e da enzima (PERSSON *et al.*, 2002). Entretanto, foram também relatadas algumas desvantagens, como perda de atividade enzimática, limitações difusionais, além de muitas vezes, dependendo do tipo de imobilização, os métodos serem trabalhosos e bastante demorados e acarretarem custos adicionais na produção de um biocatalisador (VILLENEUVE *et al.*, 2000; LIMA e ANGNE, 1999).

As técnicas usualmente empregadas para imobilizar enzimas em suportes sólidos são baseadas em mecanismos físicos e químicos (GIRELLI e MATTEI, 2005). Os principais processos de imobilização podem ser classificados em cinco tipos, segundo Straathof e Adlercreutz (2000): **(a) Separação por membranas** - neste método, a enzima encontra-se fisicamente separada do meio de reação, através de uma película (membrana) semipermeável. Por sua vez, este tipo pode ser subdividido em: encapsulamento, onde a enzima é imobilizada no interior de esferas não-rígidas, cujo envoltório é constituído por um polímero geleiforme e semipermeável; ou em membranas fibrosas semipermeáveis, que consistem no confinamento da enzima numa dada região da solução, através de uma membrana semipermeável. Para este método, as limitações difusionais são intensas; **(b) Microencapsulação**, que consiste na preparação de um sistema emulsificado, onde a enzima está confinada no interior de micelas; **(c) Entrelaçamento em polímeros** - neste caso, as enzimas são aprisionadas entre as malhas de um polímero geleiforme. A eficiência do entrelaçamento, a permeabilidade do gel e sua resistência mecânica dependerão da composição dos reagentes e da natureza do monômero utilizado; **(d) Por formação de ligação covalente** - como o próprio nome

sugere, a enzima é ligada ao suporte inerte mediante ligações químicas covalentes, que são normalmente estabelecidas entre os aminogrupos primários e o anel fenólico dos aminoácidos constituintes da enzima e os grupos reativos do suporte. Como as interações entre a enzima e o suporte são fortes, pode ocorrer perda da atividade causada por modificações na estrutura cataliticamente ativa; **(e) Imobilização por adsorção** - este método consiste na adsorção da enzima em um suporte inerte, por meio de ligações eletrostáticas e hidrofóbicas, tais como interações iônicas, forças de “van der Waals”, ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo e interações hidrofóbicas. Este tipo de imobilização causa uma pequena modificação na estrutura nativa da enzima, se comparado aos outros tipos de imobilização, e por isso, geralmente não promove perda da atividade catalítica (SALIS *et al.*, 2003).

2.3.3 Atividade de água (a_w) do sólido fermentado

A atividade de água de um material é uma medida da sua disponibilidade de água, relacionada com a umidade relativa ao equilíbrio do meio, expressa como a razão entre a pressão de vapor da água presente no material (p_s) e a pressão de vapor da água pura (p_0), na mesma temperatura ($a_w = p_s / p_0$). Os valores de atividade de água são expressos em relação à umidade total do sistema considerado, situando-se os valores de a_w entre 0 e 1 (HALLING, 1984).

A atividade de água (a_w) é um parâmetro crucial na biocatálise em meio orgânico, especialmente quando se trata de reações de síntese ou hidrólise de ésteres, porque o teor de água influencia no equilíbrio da reação, bem como na manutenção da estrutura tridimensional da enzima (GAYOT e COULON, 2003). Salis *et al.* (2005) encontraram atividades máximas para a lipase de *Pseudomonas cepacia* durante a reação de alcoólise da trioleína quando os valores de a_w no meio se encontram entre 0,4 e 0,6.

2.4 LIPASES NA BIOSÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS DE BIODIESEL

Os ésteres etílicos são compostos valiosos devido à sua maior volatilidade em relação aos ácidos graxos de origem, sendo utilizados na análise e caracterização de TAGs e, em larga escala, são empregados na formulação de medicamentos, lubrificantes, e são os principais componentes biodiesel (JACKSON, MBARAKA e SHANKS, 2006).

A Figura 3 apresenta o mecanismo de reação proposto por Al-Zuhair, Lig e Jun (2007) de transesterificação via catálise enzimática.

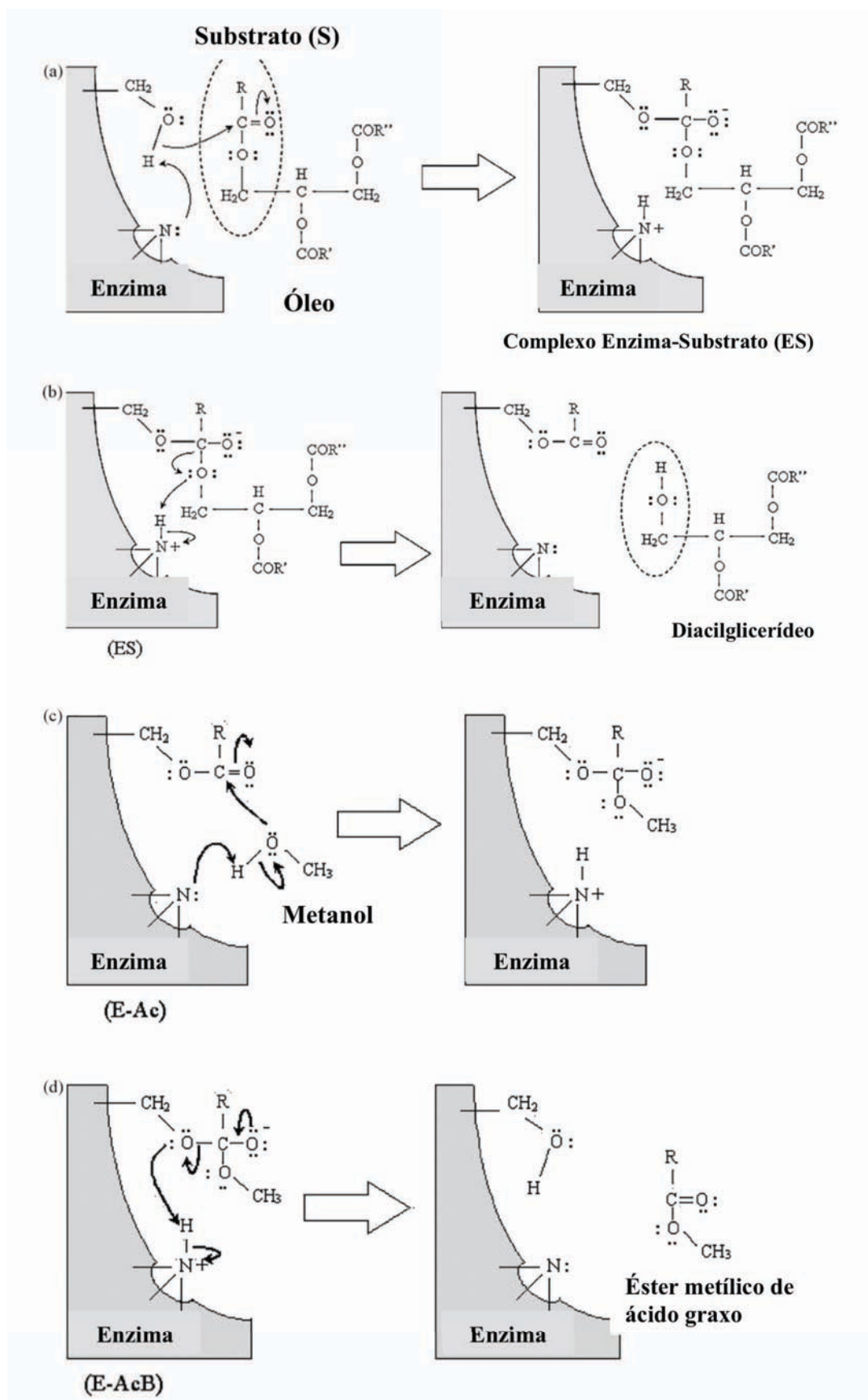


FIGURA 3 – MECANISMO PROPOSTO PARA A REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO CATALISADA POR LIPASE.
(ADAPTADO DE: Al-Zuhair, Lig e Jun, 2007).

Assim como na catálise alcalina, na primeira etapa (a), a base (grupo amino, da enzima) desprotona a hidroxila do ácido carboxílico da estrutura da proteína. A segunda etapa (b) é uma etapa de adição nucleofílica, onde há a formação do complexo enzima-substrato. Na sequência, o próton do ácido conjugado do grupo amino é abstraído pelo oxigênio do grupo alquila do substrato, e uma molécula de diacilglicerídeo é formada. A partir do diacilglicerídeo forma-se o monoacilglicerídeo e posteriormente uma molécula de glicerol. O álcool é desprotonado pela base (c), atacando o átomo de carbono da carbonila, onde um intermediário tetraédrico é formado. Finalmente, em (d) o próton é transferido do ácido conjugado, do grupo amino da enzima, para o átomo de oxigênio do complexo enzima-álcool, resultando no éster alquílico do ácido graxo e glicerol (REETZ e JAEGER, 1998).

No caso da produção do biodiesel, fontes promissoras e de baixo custo, como os resíduos de fritura de restaurante e borras ácidas (derivadas da indústria de refino de óleo lubrificante), muitas vezes têm um alto teor de ácidos graxos livres. Uma alternativa para resolver este problema seria realizar uma etapa de pré-tratamento na presença de lipases, evitando assim, a saponificação e consequente necessidade de neutralização do meio antes da etapa de transesterificação (HSU *et al.*, 2004).

O processo enzimático consome menos energia, evita o uso de compostos químicos com alto potencial poluente e gera um produto com menos contaminantes químicos (HASAN, SHAH e HAMEED, 2006; YIN, LIU e TAN, 2006; KIM, YOUN e SHIN, 2006; KRIEGER *et al.*, 2004; FERNANDES *et al.*, 2004).

A produção do biodiesel em escala industrial utilizando lipases, no entanto, é bastante rara, sendo pouco adotada devido ao alto custo do biocatalisador, longos tempos de reação e, em alguns casos, a necessidade de remoção do solvente ao final da reação (JAEGER e EGGERT, 2002; ISO *et al.*, 2001). Como resultado destas dificuldades, existe apenas um processo em escala industrial com base na transesterificação enzimática, este encontra-se na China e tem uma capacidade de 20.000 toneladas de éster por ano (DU *et al.*, 2008).

Por este motivo, a grande maioria das aplicações de lipases na síntese do biodiesel estão ainda restritas à escala de laboratório (TABELA 1).

Com relação à produtividade (mg de éster produzido em 1 h, por 1 g de catalisador), observa-se na Tabela 1 que estas variam entre 9 até 6000 mg/h.g_{catalisador}, para as reações de esterificação, sendo que as maiores produtividades reportadas para este tipo de sistema (500 e 6000 mg/h.g_{catalisador}) não são diretamente proporcionais aos resultados em conversão de éster (QIN *et al.*, 2008; YADAV e DHOOT, 2009, respectivamente).

TABELA 1 - UMA SELEÇÃO DE ESTUDOS RECENTES SOBRE A PRODUÇÃO DE BIODIESEL EM PROCESSOS DE ESTERIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES E TRANSESTERIFICAÇÃO DE ÓLEOS E GORDURAS UTILIZANDO LIPASES. (continua)

	Microrganismo produtor da lipase	Tipo de Enzima/Suporte	Ácido/Óleo	Álcool	Solvente	Conversão (%)	Tempo (h)	Produtividade (mg/h.g _{cat}) *	Referência
Esterificação	<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB 11	Farelo de milho (sólido fermentado)	Ácido oleico	Etanol	<i>n</i> -heptano	94	18	9	FERNANDES <i>et al.</i> (2007)
	<i>Candida rugosa</i>	Poliuretano hidrofílico (Hypol FHP)	Ácido butírico	Etanol	<i>n</i> -hexano	80	36	5	PIRES-CABRAL <i>et al.</i> (2010)
	<i>Rhizopus chinensis</i>	Células inteiras liofilizadas	Ácido oleico	Metanol	Ausência	96	24	500	QIN <i>et al.</i> (2008)
	<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB 11	Accurel EP 100	Ácido oleico	Etanol	<i>n</i> -heptano	100	3	67	SALUM <i>et al.</i> (2008)
	<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB 11	Bagaço de cana e farinha de girassol (sólido fermentado)	Ácido oleico	Etanol	<i>n</i> -heptano	95	24	70	SALUM <i>et al.</i> (2010)
	<i>Candida antarctica</i> Novozyme (435)	Resina acrílica	Ácido láurico	Álcool cinâmico	tolueno	60	2	6000	YADAV e DHOOT (2009)
Transesterificação	<i>Candida sp.</i>	Malha têxtil	Óleo de cozinha usado	Metanol	<i>n</i> -hexano	91	** nc	** nc	CHEN <i>et al.</i> (2009)
	<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB 11	Farelo de milho (sólido fermentado)	Óleo de Milho	Etanol	<i>n</i> -heptano	95	120	4	FERNANDES <i>et al.</i> (2007)
	<i>Rhizopus oryzae</i>	Cubos de espuma de poliuretano	Óleo de Soja	Metanol	Ausência	91	50	50	HAMA <i>et al.</i> (2007)
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Resina acrílica	Óleo de Soja	Etanol	Ausência	84	7	140	HERNÁNDEZ-MARTÍN e OTERO (2008)

TABELA 1 - UMA SELEÇÃO DE ESTUDOS RECENTES SOBRE A PRODUÇÃO DE BIODIESEL EM PROCESSOS DE ESTERIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES E TRANSESTERIFICAÇÃO DE ÓLEOS E GORDURAS UTILIZANDO LIPASES. (conclusão)

Transesterificação	Microrganismo produtor da lipase	Tipo de Enzima/Suporte	Ácido/Óleo	Álcool	Solvente	Conversão (%)	Tempo (h)	Produtividade (mg/h.g _{cat}) *	Referência
	<i>Burkholderia cepacia</i>	Gel hidrofóbico	Óleo de Soja	Metanol	Ausência	67	1	320	NOUREDDINI <i>et al.</i> (2005)
	<i>Rhizopus chinensis</i>	Células inteiras liofilizadas	Óleo de Soja	Metanol	<i>n</i> -heptano	87	72	150	QIN <i>et al.</i> (2008)
	<i>Candida antarctica</i> (N435)	Suporte hidrofóbico	Gordura animal	Etanol	<i>t</i> -butanol	65	24	1000	RIVERA <i>et al.</i> (2009)
	<i>Candida antarctica</i> (N435)	Suporte hidrofóbico	Gordura animal	Etanol	Ausência	80	48	567	RIVERA <i>et al.</i> (2009)
	<i>Candida antarctica</i>	Resina acrílica	Óleo de Semente de algodão	Metanol	<i>t</i> -butanol	97	24	2433	ROYON <i>et al.</i> (2007)
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Accurel® MP1004	Óleo de Soja	Metanol	Ausência	96	49	320	SALIS <i>et al.</i> (2008)
	<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB 11	Bagaço de cana e farinha de girassol (sólido fermentado)	Óleo de Soja	Etanol	Ausência	95	46	145	SALUM <i>et al.</i> , 2010
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Enzima livre	Óleo de Milho	Metanol	<i>t</i> -butanol	86	12	609	WANG <i>et al.</i> (2008)

* Produtividade = massa de éster (mg) produzido em 1 h de reação, por 1 g de catalisador.

** Dados não citados pelo autor.

Para as reações de transesterificação, as produtividades variam entre 4 até 2433 mg/h.g_{catalisador}, onde as maiores produtividades reportadas (2433, 1000 e 609 mg/h.g_{catalisador}) se referem a ensaios onde se utilizou o *t*-butanol como cossolvente e enzimas comerciais como catalisadores da reação (ROYON *et al.*, 2007; RIVERA, VILLANUEVA e SANDOVAL, 2009; WANG, WU e ZONG, 2008, respectivamente).

Ressalta-se, ainda na Tabela 1, os trabalhos de Fernandes *et al.* (2007) e de Salum *et al.* (2010), pois ambos utilizaram pioneiramente o sólido fermentado contendo a lipase de *B. cepacia* LTEB11 como catalisador. Nos primeiros trabalhos (FERNANDES *et al.*, 2007), as produtividades atingidas, tanto para as reações de esterificação (9 mg/h.g_{catalisador}) como para as de transesterificação (4 mg/h.g_{catalisador}), foram baixas e as reações foram realizadas em presença do cossolvente *n*-heptano, no sistema de frascos agitados. Já os resultados de esterificação reportados por Salum *et al.* (2010) mostraram uma produtividade mais elevada (70 mg/h.g_{catalisador}) para a mesma reação, estes resultados podem ser justificados, pois, no caso de Salum *et al.* (2010) a quantidade de sólido fermentado adicionado ao meio foi de apenas 170 mg, enquanto que Fernandes *et al.* (2007) utilizaram 500 mg de sólido de fermentado. No caso da reação de transesterificação, Salum *et al.* (2010) reportaram uma produtividade ainda mais alta (145 mg/h.g_{catalisador}) que aquela reportada por Fernandes *et al.* (2007).

Na Tabela 1 são apresentados os dados de conversão em éster das reações de transesterificação catalisadas tanto por lipases comerciais como por lipases produzidas em laboratório. Sabendo-se das vantagens econômicas em se utilizar lipases não comerciais, sobretudo aquelas produzidas por FES, observa-se conversões elevadas em éster (de 65 a 96%) tanto com lipases comerciais (RIVERA, VILLANUEVA e SANDOVAL, 2009; HERNÁNDEZ-MARTÍN e OTERO, 2008; SALIS *et al.*, 2008; WANG, WU e ZONG, 2008; ROYON *et al.*, 2007) quanto com as lipases não comerciais (de 67 a 95%) (CHEN *et al.*, 2009; QIN *et al.*, 2008; HAMA *et al.*, 2007; NOUREDDINI, GAO e PHILKANA, 2005), com destaque para aquelas produzidas por FES (95% de conversão em éster) (SALUM *et al.*, 2010; FERNANDES *et al.*, 2007), onde o sólido fermentado é adicionado diretamente ao meio reacional, reduzindo ainda mais os custos de produção dos ésteres.

2.4.1 Sistemas reacionais utilizados em biocatálise

Nos últimos anos, têm-se realizado vários estudos sobre reações enzimáticas em meio orgânico. Em sentido restrito, podem ser considerados como ambientes não-aquosos os solventes orgânicos, os fluidos supercríticos, os gases, os substratos

líquidos ou misturas de substratos livres de solvente (KRIEGER *et al.*, 2004; LIMA e ANGNES, 1999). Considerando os sistemas reacionais utilizados na biocatálise, os meios aquo-restritos podem ser classificados em sistemas macro-heterogêneos, em que se observa separação de fases, e micro-heterogêneos, onde a separação de fases não pode ser observada macroscopicamente (GERARD e JULIAN, 1999).

É conhecido, hoje, que as lipases, entre outras enzimas, permanecem ativas em misturas reacionais contendo altas proporções de solventes orgânicos (DIAZ *et al.*, 2006; PENCREACH e BARATTI, 1996).

Este tipo de sistema tem sido utilizado essencialmente em reações de esterificação e transesterificação, conduzindo normalmente a conversões bastante elevadas, mas com atividades catalíticas baixas devido à limitações difusionais e de transferência de massa entre a enzima e os substratos e produtos (CHEN *et al.*, 2009; SALUM *et al.*, 2008; ROYON *et al.*, 2007).

2.4.2 Variáveis e condições que podem afetar o processo biocatalisado

Dentre os diversos trabalhos reportados na literatura citados na Tabela 1, a maioria deles utilizou lipases comerciais imobilizadas. Alguns autores (FERNANDES *et al.*, 2007) utilizaram delineamento fatorial para a otimização das condições reacionais, visto que o número de variáveis e condições experimentais que podem afetar o processo biocatalisado é grande. Dentre estes fatores, citam-se a origem da enzima, quantidade de enzima no meio reacional, razão molar entre os reagentes, tipo de álcool utilizado, uso de cossolvente na reação, quantidade de água adicionada no meio e temperatura da reação (BOUAID, MARTINEZ e ARACIL, 2007), cujos efeitos passarão a ser relatados a seguir. Estes efeitos quase sempre são independentes do tipo de reação – esterificação ou transesterificação.

2.4.2.1 Efeito da concentração dos substratos

A razão molar dos substratos é uma variável de grande influência na reação de síntese de biodiesel. A razão estequiométrica da reação de transesterificação é de 1:3 (óleo:álcool), porém em alguns casos (RIVERA, VILLANUEVA e SANDOVAL, 2009; SALIS *et al.*, 2008; WANG, WU e ZONG, 2008) utiliza-se um excesso de álcool

a fim de assegurar uma alta velocidade de reação e minimizar as limitações de difusão dos substratos. Entretanto, níveis excessivos de álcool podem inibir a atividade da enzima diminuindo sua atividade catalítica ao longo da reação de transesterificação (NOUREDDINI, GAO e PHILKANA, 2005). Conforme descrito por Yu *et al.* (2007), alcoóis de cadeia curta, como o etanol, podem perturbar a estrutura funcional da enzima por retirar sua camada de “água essencial”. Este efeito inibitório do etanol se deve ao fato de esse tipo de substrato alterar a conformação molecular ativa da enzima, reduzindo sua atividade catalítica. As moléculas de água apresentam maior afinidade pela ligação com o álcool do que com a enzima e, essa desidratação da enzima pelo etanol diminui sua flexibilidade conformacional, uma vez que a água serve como uma espécie de lubrificante da estrutura da enzima (STRAATHOF e ADLERCREUTZ, 2000). Além do fato de que alcoóis de cadeia menor, como metanol e etanol, apresentam uma solubilidade muito baixa nos óleos normalmente utilizados para produção de biodiesel. Desta forma, o uso de um álcool de alta polaridade para a reação de transesterificação pode implicar na necessidade do uso de um solvente exógeno (cossolvente). A utilização de cossolventes na produção enzimática do biodiesel é mencionada como sendo inconveniente, mas a recuperação do solvente é uma prática comum na indústria química. Assim, em uma escala industrial, solventes podem ser recuperados juntamente com o álcool, após a reação enzimática (ROYON *et al.*, 2007), mas é evidente que a realização da síntese do biodiesel em meio livre de solvente é sempre desejada.

2.4.2.2 Efeito da temperatura

Além da concentração dos substratos, a temperatura também foi relatada como um fator que afeta a velocidade de reação catalisada por enzimas consideravelmente, por dois mecanismos distintos: o mecanismo químico, onde a velocidade de reação aumenta com a temperatura pelo aumento da energia cinética dos reagentes (substratos) e pelo aumento da transferência de massa, e o mecanismo associado à desnaturação da enzima pelo aumento da temperatura. Esta tendência foi observada em todos os estudos que investigaram o efeito da temperatura sobre a produção de biodiesel por lipases. A temperatura ideal para lipases, onde a desnaturação da enzima ainda é baixa e a atividade catalítica é alta na reação de transesterificação, de acordo com Al-Zuhair, Lig e Jun (2007), Nouredini, Gao e Philkana, 2005 e Fukuda, Kondo e Noda (2001) foi determinada como estando em

torno de 40°C. Entretanto, este valor depende em grande parte da enzima e de suas características de atividade e estabilidade em solventes orgânicos, sendo difícil de generalizar.

2.4.2.3 Efeito da água

Reações de alcoólise não envolvem água, entretanto, o controle da quantidade de água no meio é importante, já que a água atua na manutenção da conformação ativa da enzima, e que elevados teores de água tendem a promover a hidrólise do substrato, o que reduz o rendimento do produto (SALIS *et al.*, 2005). À medida que se aumenta o teor de água, a reação pode ter seu equilíbrio deslocado no sentido da hidrólise, que começa a competir com síntese, tanto na esterificação quanto na transesterificação (NOUREDDINI, GAO e PHILKANA, 2005).

Na esterificação este controle deve ser melhor acompanhado, uma vez que a água é um dos produtos desta reação. Uma característica importante, no caso da catálise enzimática, é que os ácidos graxos produzidos pela hidrólise podem ser convertidos em seus ésteres. Como o teor de água nos sistemas orgânicos utilizados em biocatálise é reduzido, e como esta água pode estar ligada e não disponível para reações, considera-se mais lógico falar em termos de atividade de água (a_w), em vez de porcentagem de água (% m/m) no sistema (SHAH e GUPTA, 2006). Contudo, para um processo como o da produção de biodiesel, onde o objetivo final é o de trabalhar em larga escala, seria mais conveniente otimizar o processo simplesmente em termos de adição de diferentes quantidades de água ao meio reacional.

Wang, Wu e Zong (2008) investigaram o efeito da adição de diferentes quantidades de água (0 - 5%) ao óleo de milho na reação de transesterificação. Os resultados mostraram que, quando o teor de água foi inferior a 2,5%, o rendimento da reação em ésteres metílicos foi ligeiramente aumentado com o aumento do teor de água. Quando o teor de água foi superior a 2,5%, no entanto, o rendimento foi menor. Ban *et al.* (2001) estudaram a adição de água à reação de metanólise do óleo de soja catalisada pela lipase de *Rhizopus oyzae* imobilizada em espuma de poliuretano e, obtiveram um acréscimo de 58% na conversão dos ésteres com 15% (m/m) de água adicionados ao meio em relação ao meio sem adição de água.

Salum *et al.* (2010) estudaram a adição de 1% (m/m) de água ao meio reacional na etanólise do óleo de soja catalisada pela lipase de *B. cepacia* produzida por FES, obtendo, assim, uma melhora na conversão de 86% par 95% em 46 h.

2.4.2.4 Efeito da concentração do álcool

A maior parte dos estudos feitos sobre a produção enzimática de biodiesel a partir de óleos vegetais foi o efeito do álcool (AL-ZUHAIR, LIG e JUN, 2007). Desconsiderando a baixa solubilidade dos alcoóis de cadeia curta nos óleos e gorduras geralmente utilizados, grande parte das reações de alcoólise de TAGs relatadas até agora foram realizadas com mais do que a quantidade estequiométrica de metanol ou etanol (NOUREDDINI, GAO e PHILKANA, 2005; SHIMADA *et al.*, 2002).

Um grande problema das reações envolvendo lipases e alcoóis de cadeia curta, como metanol e etanol, é que esses alcoóis podem agir como inibidores de enzimas, diminuindo sua atividade. Em alguns casos, a inibição é competitiva, onde ocorre a ligação de moléculas do solvente ao sítio ativo da enzima (AL-ZUHAIR, LIG e JUN, 2007; YADAV e DEVI, 2004). Em outros casos, o álcool (de alta polaridade) retira a água de hidratação da enzima, alterando sua conformação nativa, o que provoca a perda da atividade catalítica, ou seja, a desnaturação (SHIMADA *et al.*, 2002). Desta forma, alguns pesquisadores (CHEN *et al.*, 2009; QIN *et al.*, 2008; WANG, WU e ZONG, 2008; HAMA *et al.*, 2007; SHIMADA *et al.*, 2002; KAIEDA *et al.*, 2001) testaram a reação de transesterificação catalisada por lipase com adições sucessivas de álcool, afim de reduzir o efeito de desnaturação da lipase pelo álcool. Shimada *et al.* (2002) relataram que a adição de metanol em etapas reduziu a inativação da lipase de *Candida antarctica* durante a reação de transesterificação, obtendo-se rendimento de 90% em ésteres metílicos a partir de óleo de fritura. Salum *et al.* (2010) reportaram uma melhoria nos resultados de conversão em éster quando adicionou-se o etanol em 3 etapas (92% em 70 h), quando comparados àqueles onde o etanol foi adicionado em uma única etapa (77% em 70 h), durante a reação de etanólise do óleo de soja catalisada pela lipase de *B. cepacia* produzida por FES.

A utilização de cossolventes como *t*-butanol (RIVERA, VILLANUEVA e SANDOVAL, 2009; WANG, WU e ZONG, 2008; ROYON *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2006), *n*-heptano (QIN *et al.*, 2008; SALUM *et al.*, 2008; FERNANDES *et al.*, 2007) e *n*-hexano (CHEN *et al.*, 2009; AL-ZUHAIR *et al.*, 2006) demonstraram evitar a inativação da lipase pelo álcool, uma vez que essas reações forneceram conversões altas em éster.

2.4.2.5 Efeito do cossolvente

Um sistema que tem sido muito utilizado em reações de esterificação e transesterificação utilizando lipases é o chamado “meio livre de solvente”, onde o meio reacional é constituído apenas pelos substratos da reação e o biocatalisador (GIRALDO *et al.*, 2007; FORESTI e FERREIRA, 2005). Apesar da vantagem evidente de não se ter um solvente exógeno (cossolvente), a atividade enzimática em meios livres de solventes normalmente é muito reduzida, devido à desnaturação da enzima. Isto é atribuído geralmente à remoção da água de hidratação da enzima causada pelo solvente hidrofílico, necessária para a manutenção da estrutura cataliticamente ativa, no caso do biodiesel, o metanol ou etanol (KAIEDA *et al.*, 2001; SHIMADA *et al.*, 1999). Por outro lado, solventes hidrofóbicos são utilizados no meio reacional em biocatálise para proteger a enzima da desnaturação, uma vez que podem impedir a remoção da água de solvatação e também podem interagir favoravelmente com as porções hidrofóbicas da enzima, tornando-a mais ativa e estável (NOUREDDINI, GAO e PHILKANA, 2005; SHIMADA *et al.* 2002; KAIEDA *et al.*, 1999).

Comparando-se o sistema envolvendo solventes exógenos com o sistema livre de cossolvente, na maioria dos casos a produtividade da reação é maior em meio de cossolvente. Como os resultados reportados por Rivera, Villanueva e Sandoval (2009), onde obtiveram conversões de 80% em 48 h, no caso do sistema livre de cossolvente, e 65% em 24 h para o sistema com *t*-butanol, para a reação de etanólise de gordura animal catalisada pela lipase de *C. antarctica*. Isto pode ser observado na Tabela 1, pois, a maior produtividade (2433 mg/h.g_{catalisador}) reportada é para uma reação de transesterificação em *t*-butanol (ROYON *et al.*, 2007).

Entretanto, devido às vantagens de maximização da concentração dos substratos, baixo custo dos substratos por serem facilmente obtidos de matérias-primas renováveis, evitando-se o uso de solventes e de sua remoção no final da reação (QIN *et al.*, 2008; FORESTI e FERREIRA, 2005), os processos chamados de “livres de cossolvente” são mais econômicos e menos impactantes para o meio ambiente (ZNIDARSIC-PLAZL e PLAZL, 2009) e são sempre objeto de muitos estudos. Este tipo de sistema tem sido empregado com bons rendimentos (acima de 90%) para reações de esterificação (MARCHETTI e ERRAZU, 2008; QIN *et al.*, 2008) e reações de transesterificação para produção de biodiesel (acima de 80%) (SALUM *et al.*, 2010; RIVERA, VILLANUEVA e SANDOVAL, 2009; HERNÁNDEZ-MARTÍN e OTERO, 2008; SALIS *et al.*, 2008; HAMA *et al.*, 2007).

3. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral o estudo e a otimização do processo da síntese enzimática de ésteres etílicos, com enfoque nos ésteres que compõem o biodiesel, empregando lipases de *Rhizopus microsporus* produzidas por fermentação no estado sólido.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir a lipase de *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM por fermentação em estado sólido;
- Empregando o sólido fermentado contendo a lipase:
 - otimizar, por meio de delineamento fatorial, a síntese de ésteres etílicos por reação de esterificação, estudando os efeitos dos parâmetros temperatura, razão molar (ácido/álcool) e da concentração enzimática no meio;
 - otimizar a síntese de ésteres etílicos por reação de transesterificação (alcoólise), estudando os efeitos da razão molar dos substratos, da temperatura e da concentração enzimática no meio, empregando um delineamento fatorial.
- Para ambas as reações de síntese, estudar o efeito da remoção do cossolvente exógeno do meio, visando à eliminação deste do meio reacional;
- Após otimizar as condições de reação de transesterificação, estudar o efeito da adição parcial do etanol e da adição de água ao meio reacional, no rendimento da reação;
- Tomando por base as condições otimizadas nos itens anteriores, estudar a produção dos ésteres etílicos por transesterificação em biorreator de leito fixo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental deste trabalho foi realizada no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise (LTEB) do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná e no Centro de Pesquisa e Assistência Tecnológica do Estado de Jalisco (CIATEJ) em Guadalajara, México.

O preparado enzimático utilizado foi um sólido fermentado seco contendo atividade lipolítica, produzido por fermentação no estado sólido. Neste trabalho, este sólido seco utilizado como biocatalisador foi, por vezes, denominado de “sólido fermentado”.

Substratos da reação de esterificação: para as reações de esterificação, bem como para a curva analítica do ácido oleico, o padrão utilizado (Synth) tinha 58% de pureza.

Substratos da reação de transesterificação: foram utilizadas diferentes marcas de óleo de milho comercial em cada uma das duas etapas deste trabalho, ambas foram adquiridas em supermercado local. Na etapa realizada no LTEB, o óleo de milho foi da marca Liza (Cargill do Brasil) e nos experimentos realizados no CIATEJ, foi utilizado o óleo da marca Maceite (Promer).

O *n*-heptano utilizado nas reações de síntese de ésteres, tanto por esterificação quanto por transesterificação, foi adquirido da Vetec com pureza de 99,5%; o etanol utilizado foi adquirido da Synth, com pureza de 99,5%.

Para a dosagem da atividade de hidrólise do sólido fermentado foram utilizados como substratos a tributirina (C₄, pureza 98%), tricaprilina (C₈, pureza 99%) e trioleína (C₁₈, pureza 65%) (Sigma).

Todos os padrões cromatográficos foram da Sigma, com grau analítico de pureza.

Os demais reagentes foram de grau analítico e tiveram o grau de pureza requerido no experimento.

4.1 PRODUÇÃO DA LIPASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

4.1.1 Microrganismo

A produção da lipase por FES foi feita com uma cepa fúngica termotolerante do gênero *Rhizopus*, isolada de resíduos de coco em Guadalajara (México) e cedida pelo Professor Jesús Córdova (Universidade de Guadalajara, México). Esta cepa foi caracterizada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA – UNICAMP) e catalogada como *R. microsporus* CPQBA 312-07 DRM.

4.1.2 Manutenção do microrganismo e preparo do inóculo

Para manutenção, a cepa foi inicialmente inoculada em tubos inclinados contendo o meio BDA (batata, dextrose ágar) e incubada a 30°C durante 7 dias. O tubo contendo o fungo foi então recoberto com óleo mineral estéril e armazenado à temperatura ambiente.

Para preparo do inóculo, após o período de incubação, os esporos foram raspados, suspensos em água destilada estéril contendo Tween 80 (0,01%, v/v) e submetidos à agitação até a obtenção de uma suspensão. A concentração de esporos na suspensão foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. Um volume desta suspensão foi inoculado no meio sólido de cultivo (farinha de semente de girassol e bagaço de cana-de-açúcar), de maneira tal que a concentração final no meio sólido fosse entre 10^7 e 10^8 esporos/gSS (esporos por grama de substrato seco). Em seguida, o substrato inoculado foi incubado em estufa por 18 h, até que a atividade lipolítica no sólido [determinada contra o substrato tricaprilina pelo método titulométrico] (item 4.6.1) fosse máxima, conforme descrito em 4.1.5.

4.1.3 Caracterização dos substratos utilizados no cultivo do microrganismo

A composição centesimal dos substratos farinha de semente de girassol e bagaço de cana-de-açúcar foi determinada pelo CEPPA (Centro de Pesquisa e

Processamento de Alimentos, UFPR). Para ambos os substratos, a umidade, resíduo mineral fixo e lipídios foram determinados segundo os métodos do Instituto Adolfo Lutz (2005), proteínas e fibras, segundo os métodos da AOAC (2005) e os carboidratos determinados de acordo com a Resolução RDC nº 360 de 23 de dezembro 2003 (BRASIL, 2003).

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado foi composto de 0,49% em lipídios; menos de 0,1% em carboidratos solúveis; 0,88% em proteínas; 88,20% em fibras; umidade de 9,01% e 2,04% em resíduo mineral fixo, todos os valores expressos em percentagem de massa.

A farinha de semente de girassol apresentou a seguinte composição centesimal (% m/m): lipídios 25,9%; carboidratos totais 45,7%; proteínas 18,0% e fibras 28,5%.

4.1.4 Preparo do substrato para os cultivos

O substrato dos cultivos FES consistiu em uma mistura (1:1) de bagaço de cana-de-açúcar, fornecido pela Indústria Melhoramentos (Jussara, PR), e farinha de semente de girassol. O bagaço de cana foi utilizado sem lavagem e classificação já que ALBERTON *et al.* (2010) determinaram que não havia necessidade deste procedimento. Para obtenção da farinha, sementes de girassol, adquiridas no comércio local, foram trituradas em moinho elétrico e peneiradas, sendo utilizada a fração com granulometria entre 0,8 e 2,0 mm de diâmetro.

4.1.5 Cultivo de Fermentação em Estado Sólido (FES)

Em um procedimento-padrão, as fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyers de 250 mL, com 10 g da mistura dos substratos (farinha de semente de girassol e bagaço de cana-de-açúcar), numa proporção de 1:1. Os substratos foram umedecidos com tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ pH 7,0 para ajustar o teor de umidade para 80% (m/m, base úmida). A umidade foi determinada em balança de infravermelho (Gehaka), utilizando 1 g de amostra. Os frascos foram esterilizados em autoclave, resfriados e inoculados com o volume requerido da suspensão de esporos do inóculo líquido (4.1.2). Os frascos inoculados foram incubados em estufa durante 18 h a 40°C

(ALBERTON *et al.*, 2010).

Após a fermentação, o sólido foi liofilizado. A secagem foi realizada em liofilizador Jouan LP3® modelo 60, durante aproximadamente 24 h a 0,1 mbar e - 45°C. Parte do material sólido foi reservado à dosagem da atividade enzimática diretamente no sólido, utilizando o método titulométrico em pHStat (4.6.1). A atividade lipolítica foi expressa como unidades de atividade enzimática por grama de sólido seco (U/gSS).

O sólido fermentado liofilizado foi armazenado em sacos plásticos, mantido em refrigerador a 4°C e utilizado diretamente nas reações de esterificação e transesterificação.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO

Para a caracterização, o sólido fermentado foi seco em liofilizador (como descrito em 4.1.5), e a sua atividade de água (a_w) determinada utilizando equipamento AquaLab Série 3 (Labcell, Basigstoke).

4.2.1 Determinação da atividade lipolítica pela hidrólise dos triacilglicerídeos

A atividade lipolítica do sólido fermentado foi inicialmente caracterizada em meio aquoso pelo método titulométrico (4.6.1), adicionando-se 0,25 g do sólido diretamente ao meio reacional, usando tributirina (C_4), tricaprilina (C_8) e trioleína (C_{18}) como substrato. Como procedimento padrão para dosagem de atividade do sólido, adotou-se ao longo do trabalho a tricaprilina. A atividade foi expressa em relação à massa seca de sólido fermentado, em U/gSS.

4.2.2 Efeito do tamanho das partículas do sólido na fermentação e na atividade lipolítica

Devido à heterogeneidade do tamanho das partículas do bagaço de cana utilizado na fermentação, estudou-se a influência do tamanho das partículas na

produção da atividade enzimática e no sólido seco após a fermentação. Para o estudo desse efeito, o bagaço de cana foi peneirado antes da fermentação e apenas a fração com partículas entre 0,8 e 2,0 mm de diâmetro foi adicionada aos frascos Erlenmeyer, enquanto em outros frascos o bagaço foi adicionado sem esse tratamento.

No estudo desse parâmetro após a fermentação, parte do sólido fermentado seco foi peneirada e separada em diferentes frações, e a outra parte foi moída em liquidificador (frações entre 0,8 a 4,0 mm de diâmetro). Para determinar a atividade lipolítica em cada uma dessas condições, foi utilizado o método titulométrico (4.6.1).

4.2.3 Estabilidade da lipase frente ao etanol em presença dos substratos da reação de transesterificação

Para investigar a possibilidade da eliminação do cossolvente *n*-heptano na reação de síntese de ésteres por transesterificação, verificou-se a estabilidade da atividade enzimática do sólido fermentado frente a diferentes concentrações de etanol absoluto P.A. (Synth, pureza 99,5%) durante a reação.

A estabilidade foi determinada pela atividade residual do sólido fermentado após a reação, utilizando diferentes razões molares óleo:etanol (1:1, 1:3, 1:5, 1:10 e 1:15). Ao final da reação, o sólido foi filtrado, lavado com *n*-hexano, para a retirada do excesso de óleo, e seco em dessecador à temperatura ambiente durante três dias. A atividade residual foi determinada pelo método titulométrico (4.6.1).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE MILHO UTILIZADO NAS REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO

Os dois óleos comerciais utilizados neste trabalho foram caracterizados de acordo com metodologias da AOCS e AOAC, descritas a seguir.

4.3.1 Caracterização físico-química

A porcentagem de umidade e a densidade dos óleos de milho utilizados nas reações de transesterificação foram calculadas pela pesagem, em balança analítica,

do óleo. No caso da umidade, o óleo foi seco em estufa, a 120°C, e o cálculo baseado na perda de água a essa temperatura. A porcentagem de ácidos graxos livres presentes no óleo foi determinada pelo método Ca 5a-40 da AOCS (AOCS, 1989), item 4.6.3.

4.3.1.1 Perfil de ácidos graxos das amostras de óleo de milho por derivatização e análise em CG

Para a obtenção do perfil de ácidos graxos de cada óleo de milho empregado nas reações de transesterificação realizadas nas duas etapas do trabalho, utilizou-se o método do trifluoreto de boro (AOAC, método 969.33) para derivatização das amostras e posterior análise em CG, item 4.7.1.1. Este método consiste na saponificação dos TAGs e posterior liberação e esterificação dos ácidos graxos na presença de trifluoreto de boro (BF₃). Para os cálculos da razão molar óleo/etanol, utilizada nas reações de transesterificação, utilizou-se como base a composição dos ácidos graxos encontrada por esse método.

4.4 SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS POR ESTERIFICAÇÃO EM FRASCOS AGITADOS

4.4.1 Estudos preliminares

Foi realizado um estudo cinético preliminar para a verificação de síntese do oleato de etila (ESQUEMA 5), utilizando como modelo os parâmetros e as condições adotadas por Fernandes *et al.* (2007). Os substratos foram testados em uma razão molar de 1:5 (ácido:álcool), nas concentrações de ácido oleico = 70 mmol.L⁻¹; etanol = 350 mmol.L⁻¹. As reações foram realizadas utilizando-se 1,0 g do sólido fermentado (atividade enzimática de 54 U/gSS), em *n*-heptano, a 37°C. A reação foi realizada em agitador orbital, a 180 rpm e acompanhada durante 7 h, retirando-se alíquotas em intervalos de 1 h. A conversão em éster foi avaliada pelo método de Lowry-Tinsley (1976) e calculada a partir do consumo de ácidos graxos do meio reacional, tendo como referência uma curva de calibração do ácido oleico (item 4.6.2).



ESQUEMA 5 - REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO DE SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA CATALISADA POR LIPASE.

4.4.2 Otimização da síntese de ésteres etílicos por esterificação

Depois de realizados os estudos prévios de síntese de ésteres etílicos por esterificação, foram testados os efeitos dos parâmetros experimentais temperatura (X_1), razão molar ácido/álcool (X_2) e unidades totais de enzima adicionadas ao meio (X_3), estas três variáveis foram estudadas em 2 níveis (+ 1, nível superior; - 1, nível inferior) por um delineamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central (0, nível médio) (BRUNS, BARROS NETO e SCARMINO, 1996), tendo como objetivo a otimização da reação. Os parâmetros adotados para cada variável foram: $X_1 = 30$ (- 1), 37 (0) e 44°C (+ 1); $X_2 = 1:1$ (- 1), 1:3 (0) e 1:5 (+ 1); $X_3 = 60$ (- 1), 90 (0) e 120 U (+ 1).

Foi realizado um controle negativo adicionando-se ao meio reacional sólido não fermentado, que não apresentou nenhuma conversão. Os ensaios do delineamento fatorial foram feitos em frascos Erlenmeyer de 125 mL em agitador orbital, a 180 rpm, usando 15 mL de meio orgânico com *n*-heptano como cossolvente e quantidade suficiente de sólido fermentado liofilizado para fornecer a concentração de enzima requerida pelo planejamento, em unidades de atividade enzimática de hidrólise contra a tricaprilina. A reação foi iniciada pela adição de ácido oleico (70 mmol.L⁻¹) ao meio reacional contendo álcool etílico. A concentração do álcool foi de 210, 350 e 490 mmol.L⁻¹, para os ensaios com razão molar ácido:álcool de 1:3, 1:5 e 1:7, respectivamente. Em intervalos fixos, amostras de 100 µL do meio reacional foram coletadas e analisadas pelo método de Lowry-Tinsley (4.6.2). Uma curva padrão foi construída usando ácido oleico sob as mesmas condições. O rendimento em éster foi calculado a partir do consumo de ácidos graxos livres. Este método possibilitou também o cálculo da atividade enzimática de esterificação, que foi definida como a quantidade de enzima capaz de promover o consumo de 1 µmol de ácido graxo por min.

Para medir a influência de cada variável na reação, foi calculada a contribuição de cada uma delas nas respostas estudadas. Para tal, fez-se o uso do esquema de sinais (+ 1, 0 e - 1), multiplicando-os um a um para obter os resultados

correspondentes aos coeficientes de contraste atribuídos aos efeitos principais e secundários. Em seguida, procedeu-se à somatória dos valores respeitando os sinais atribuídos e o resultado foi dividido por quatro, que corresponde ao número total de experimentos ($b^2 = 8$) dividido por 2 (EQUAÇÃO 1).

$$EP = \frac{2 [\Sigma y^+ - \Sigma y^-]}{(b^2)} \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde: EP = Efeitos principais

b^2 = número total de experimentos

y^+ = níveis máximos dos parâmetros (44°C; 120 U; RM 1:7)

y^- = níveis mínimos dos parâmetros (30°C; 60 U; RM 1:3)

4.4.3 Efeito da concentração dos substratos e da presença de cossolvente no rendimento da reação

A partir dos resultados obtidos pelo delineamento fatorial, utilizando as condições otimizadas para a reação de síntese do oleato de etila, foram realizados ensaios para eliminar o cossolvente do meio reacional. Os ensaios foram realizados conforme descrito em item anterior (4.4.1), onde o volume de *n*-heptano corresponde à maioria do meio reacional (15 mL), elevando-se a concentração dos substratos em 5 e 10 vezes, em relação àquela utilizada nos ensaios anteriores (70 mmol.L⁻¹ de ácido oleico e 210 mmol.L⁻¹ de etanol), mantendo-se 15 mL de volume do meio reacional, com consequente redução no volume de cossolvente. No primeiro caso, (aumento de 5 vezes), utilizou-se a concentração de 0,35 mol.L⁻¹ de ácido oleico para 1,05 mol.L⁻¹ de etanol, com 80% de cossolvente (v/v); no segundo caso (aumento de 10 vezes), utilizou-se 0,7 mol.L⁻¹ de ácido oleico para 2,1 mol.L⁻¹ de etanol (65% de cossolvente, v/v). Também foi realizado um experimento onde o cossolvente foi totalmente eliminado do meio reacional (meio livre de cossolvente). Neste caso, foram utilizados 30 mmol de ácido oleico e 90 mmol de etanol no meio reacional, equivalentes a 8,5 g e 4,14 g, respectivamente. As reações foram seguidas durante 4 h e seus rendimentos

em éster foram calculados a partir do consumo de ácidos graxos livres, pelo método Lowry-Tinsley (4.6.2).

4.5 REAÇÕES DE ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO

4.5.1 Transesterificação em frascos agitados

Um delineamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central foi utilizado para otimizar a reação de etanólise do óleo de milho. As variáveis independentes estudadas foram a temperatura da reação: $X_1 = 30$ (- 1), 37 (0) e 44°C (+ 1); a razão molar entre os substratos (óleo de milho:etanol): $X_2 = 1:1$ (- 1), $1:3$ (0) e $1:5$ (+ 1); a quantidade de unidades enzimáticas totais (atividade de hidrólise contra a tricaprilina): $X_3 = 60$ (- 1), 90 (0) e 120 U (+ 1). A concentração inicial do óleo de milho foi de 70 mmol.L^{-1} e, de acordo com o delineamento, as concentrações de etanol variaram em 210, 350 e 490 mmol.L^{-1} . As reações foram feitas em frascos Erlenmeyers de 125 mL, em meio orgânico contendo 15 mL de *n*-heptano, em um agitador orbital a 180 rpm, e 48 h. Ao final de cada reação, o meio reacional foi filtrado, o solvente evaporado e as amostras preparadas para análise cromatográfica, conforme descrito no item 4.7.1.2. Os ésteres etílicos (linolenato, linoleato, oleato, palmitato e estearato) foram analisados por CG (itens 4.7.1.2.1 e 4.7.1.2.2).

Os cálculos dos efeitos foram feitos conforme descrito no item 4.4.2, utilizando-se a Equação 1.

4.5.1.1 Efeito da presença de cossolvente no rendimento da reação

Utilizando as condições otimizadas pelo delineamento fatorial para a reação de etanólise do óleo de milho, a exemplo do que foi estudado para as reações de esterificação, foram realizados ensaios para eliminar o cossolvente do meio reacional. As reações foram realizadas em frascos Erlenmeyers de 125 mL, com volume total do meio reacional de 15 mL, em *n*-heptano em concentrações variáveis. Os ensaios seguiram o procedimento descrito para a reação de esterificação, onde a concentração dos substratos foi aumentada em 5 e 10 vezes e um experimento em

meio livre de cossolvente foi realizado. Para o aumento de 5 vezes, utilizou-se a concentração de $0,35 \text{ mol.L}^{-1}$ de óleo de milho para $1,05 \text{ mol.L}^{-1}$ de etanol (60% de cossolvente, v/v) e para aumento de 10 vezes, $0,70 \text{ mol.L}^{-1}$ de óleo de milho para $2,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de etanol (20% de cossolvente, v/v). Na reação livre de cossolvente, foram utilizados 15 mmol de óleo de milho e 45 mmol de etanol, correspondendo a 14 g e 2,1 g, respectivamente. As reações foram acompanhadas durante 120 h, a produção em ésteres etílicos foi avaliada por CG (item 4.7.1.2).

4.5.1.2 Efeito da adição do etanol em etapas

Sabendo-se que alcoóis de cadeia curta, como o metanol e o etanol, têm efeito inibitório sobre lipases (YU *et al.*, 2007; NOUREDDINI, GAO e PHILKANA, 2005; SHIMADA *et al.*, 2002; STRAATHOF e ADLERCEUTZ, 2000), foi estudada a reação de transesterificação com adição do etanol por etapas. Os primeiros experimentos testando a adição do etanol em etapas, foi para as reações onde a concentração dos substratos foi aumentada em 5 e 10 vezes, conforme descrito no item anterior (4.5.1.1). O primeiro equivalente molar de etanol foi adicionado já no início da reação (ponto zero), o segundo em 7 h e o terceiro equivalente molar foi adicionado após 24 h de reação. Um equivalente molar de etanol correspondeu a 0,24 g para a reação com aumento de 5 vezes a quantidade de substratos (concentração final dos substratos: óleo de milho = $0,35 \text{ mol.L}^{-1}$; etanol = $1,05 \text{ mol.L}^{-1}$) e 0,48 g para a reação com aumento de 10 vezes a quantidade de substratos (concentração final dos substratos: óleo de milho = $0,70 \text{ mol.L}^{-1}$; etanol = $2,10 \text{ mol.L}^{-1}$).

Como o ponto de conversão máxima para cada equivalente molar (33%) ainda não havia sido determinado, os experimentos seguintes (4.5.1.3 e 4.5.2) foram realizados adicionando-se o segundo equivalente molar em 24 h de reação e o terceiro em 48 h.

4.5.1.3 Efeito da adição de água no rendimento da reação

Sabe-se que a adição de pequenas quantidades de água ao meio reacional pode auxiliar nas reações de alcoólise (SHIMADA *et al.*, 2002). Por esse motivo, adicionou-se água ao meio reacional a fim de aumentar a produção em éster nas

reações de transesterificação em presença e em ausência de cossolvente. O efeito da água sobre o rendimento da reação foi investigado pela adição direta de 1% (m/m) de água, em relação à quantidade total dos substratos no meio. Em um ensaio típico, foram utilizados 15 mL de cossolvente, 70 mmol.L⁻¹ de óleo de milho, 210 mmol.L⁻¹ de etanol (120 U; 44°C). Nas reações em meio de cossolvente, para um aumento de 5 vezes da concentração dos substratos (em relação ao ensaio original), a concentração do óleo de milho foi de 0,35 mol.L⁻¹ e 1,05 mol.L⁻¹ de etanol; para um aumento de 10 vezes, foram utilizadas as concentrações de 0,70 mol.L⁻¹ de óleo de milho para 2,10 mol.L⁻¹ de etanol, com adição de 2,78 e 6,11 mmol de água destilada, respectivamente. A estes meios foi adicionado *n*-heptano até obter-se um volume total de 15 mL. O meio livre de cossolvente consistiu de 15 mmol de óleo de milho, 45 mmol de etanol e 8,89 mmol de água destilada. As reações foram acompanhadas durante 120 h, com alíquotas de 200 µL coletadas em intervalos de 24 h. As conversões em éster foram analisadas por CG (4.7.1.2).

4.5.2 Transesterificação em biorreator de leito fixo

Foi construído um biorreator de bancada em forma de coluna a fim de se estudar o processo de produção dos ésteres etílicos em leito fixo, à similaridade dos reatores utilizados para enzimas imobilizadas (BALCAO, PAIVA e MALACATA, 1996). A vantagem deste tipo de biorreator é a possibilidade de utilização de mais enzima (sólido fermentado) por volume de meio reacional.

O biorreator (FIGURA 4) consistiu em um tubo de vidro com 10 cm de altura por 1,6 cm de diâmetro interno, preenchido pelo sólido fermentado contendo a enzima. O sólido fermentado (3 g, com 231 U totais) ocupou um volume de 11 cm³. As extremidades do reator foram preenchidas com pérolas de vidro e algodão para evitar que partículas sólidas passassem para as mangueiras, dificultando o fluxo dos regentes.

As condições reacionais adotadas neste processo corresponderam àquelas obtidas anteriormente a partir do estudo de otimização da reação de etanolise do óleo de milho em reator do tipo batelada: razão molar de 1:3 (óleo:álcool), máxima quantidade de unidades enzimáticas totais no meio (231 U, atividade de hidrólise contra a tricaprilina) e temperatura de 44°C. Para esse sistema foram estudadas duas condições: a reação na presença de cossolvente e livre de cossolvente (*n*-heptano). Nos dois casos, o etanol foi adicionado ao meio em 3 etapas (0 h, 24 h e 48 h)

(4.5.1.2), uma vez que esse procedimento rendeu maiores conversões em éster para o sistema estudado anteriormente, quando comparado à adição direta do álcool.

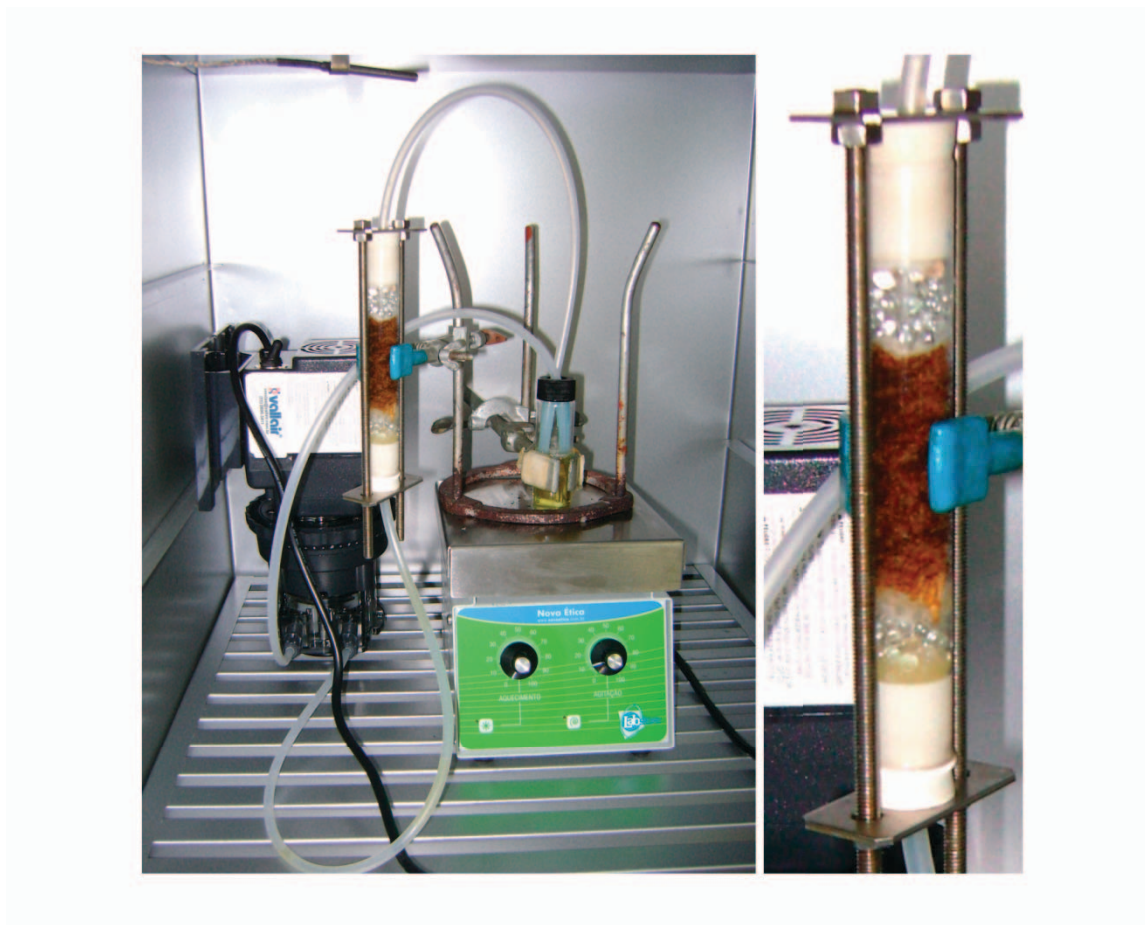


FIGURA 4 - FOTO DO BIORREATOR DE LEITO FIXO UTILIZADO NAS REAÇÕES DE ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO. EM DESTAQUE, O LEITO DE REAÇÃO, COM O SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM.

Para o sistema de cossolvente, o meio reacional consistiu de $0,7 \text{ mol.L}^{-1}$ de óleo de milho comercial da marca Liza (item 4.3), $2,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de etanol, o que corresponde a 32 e 5 g, respectivamente. A este meio foi adicionado um volume de *n*-heptano de modo a obter 50 mL da mistura. No caso da reação livre de cossolvente, o meio foi composto de 44 mmol do óleo de milho e 132 mmol de etanol, correspondendo a 40 e 6 g, respectivamente. Em ambos os casos, o substrato foi percolado em fluxo ascendente pela coluna com um fluxo volumétrico de 2 mL.min^{-1} , com o auxílio de uma bomba peristáltica. A mistura dos substratos foi previamente homogeneizada com o auxílio de um agitador mecânico antes de ser mantida em agitador magnético e o sistema, contendo a lipase e os substratos, foi pré-aquecido a

44°C, em estufa, antes do início da reação. A reação, acompanhada durante um período de 120 h, foi iniciada com o bombeamento dos substratos (óleo e etanol, ou óleo, etanol e *n*-heptano) pela coluna. Para manter constante a temperatura durante o processo, todo o sistema foi mantido em estufa. O fluxo ascendente foi mantido pela bomba peristáltica e alíquotas de 200 µL foram retiradas em diferentes intervalos de tempo na saída superior da coluna, sendo avaliada a conversão em ésteres por CG (4.7.1.2).

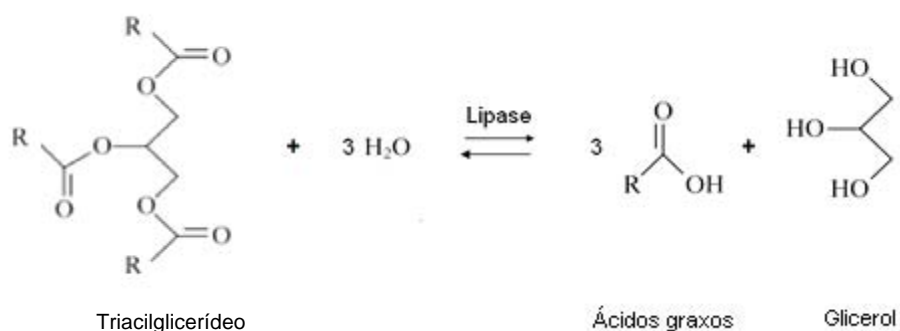
4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.6.1 Dosagem de atividade lipolítica (Hidrólise)

A dosagem de atividade lipolítica de hidrólise foi feita utilizando o sólido fermentado liofilizado diretamente no meio reacional, pelo método titulométrico em titulador automático do tipo pHStat (Metrohm 718 Stat Titrino). Este método baseia-se na metodologia proposta por Stuer, Jaeger e Winkler (1986), com modificações. O método consiste na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da lipase sobre os triacilglicerídeos (ESQUEMA 6). Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima que promove a liberação de 1 µmol de ácido graxo por minuto. Para o sólido fermentado, a atividade é expressa como unidades de atividade por grama de sólido seco (U/gSS).

Procedimento:

Para esse método, emulsões dos substratos tributirina (54 mmol.L⁻¹); tricaprilina (63 mmol.L⁻¹) e trioleína (62 mmol.L⁻¹) foram preparadas e os ácidos graxos livres foram titulados com NaOH (0,05 mol.L⁻¹) mantendo-se pH 7,0 (pH ótimo para lipases do gênero *Rhizopus*) (DIAZ *et al.*, 2006). Cada substrato foi pré-emulsificado com goma arábica (3%, m/v), CaCl₂ (2 mmol.L⁻¹), tampão Tris-HCl (0,25 mmol.L⁻¹, pH 7,0) e NaCl (150 mmol.L⁻¹) (TISS, CARRIERE e VERGER, 2001). Para cada ensaio, 20 mL da emulsão e 250 mg do sólido fermentado, foram adicionados em um vaso termostatisado (37°C), e a reação de hidrólise foi acompanhada durante 10 min.



ESQUEMA 6 - REPRESENTAÇÃO DE REAÇÃO DE HIDRÓLISE DE UM TRIACILGLICERÍDEO CATALISADA POR LIPASE.

4.6.2 Método de Lowry-Tinsley (1976)

Trata-se de um método colorimétrico que mede a coloração do complexo azul-esverdeado (715 nm) formado entre os íons Cobre II e os ácidos graxos livres (FIGURA 5), solúveis em fase orgânica. Os cálculos de concentração tiveram por base a curva analítica com o ácido oleico (Synth, pureza 58%), cuja preparação está descrita a seguir.

Este método (LOWRY e TINSLEY, 1976) foi utilizado para quantificar o teor residual de ácido oléico durante a síntese do oleato de etila catalisada pela enzima e possibilitar os cálculos dos rendimentos de esterificação e da atividade enzimática de esterificação. Neste caso, a atividade foi calculada pelo desaparecimento do ácido graxo do meio reacional. Uma unidade de atividade de esterificação corresponde à quantidade de enzima que promove a síntese de um μmol de éster na unidade de tempo e nas condições do experimento.

A atividade enzimática é calculada a partir da velocidade inicial da reação, sendo o cálculo da atividade feito a partir do gráfico da porcentagem de conversão em éster em função do tempo, tomando-se a equação da reta tangente ao início da curva (partindo do ponto zero).

Curva Analítica:

Amostras contendo 5,0 - 100 mmol de ácido oleico foram preparadas pela dissolução em balões volumétricos com 10 mL de *n*-heptano. Então, 0,25 mL do reagente acetato cúprico foram adicionados a 100 μL da solução do ácido formando

duas fases que foram misturadas vigorosamente durante 20 s usando um misturador vórtex. A mistura foi centrifugada a 3000xg por 10 min, até que a fase aquosa fosse claramente separada da fase orgânica por sedimentação. A curva analítica foi determinada a partir da medida da absorvância da solução heptânica a 715 nm contra o controle, que não continha ácidos graxos livres.

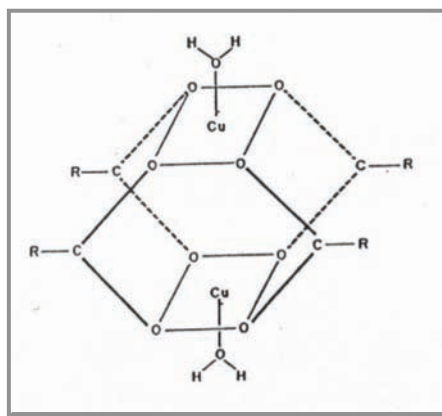


FIGURA 5 - ESTRUTURA DO COMPLEXO FORMADO ENTRE O ÍON Cu^{2+} E OS ÁCIDOS GRAXOS LIVRES EM SOLUÇÃO.

4.6.3 Determinação de ácidos graxos livres (% AGL)

A porcentagem de ácidos graxos livres (% AGL) presente tanto no ácido oléico quanto no óleo de milho, utilizados nas reações de síntese de ésteres, foi determinada por titulação alcalina de acordo com o método Ca 5a-40 da AOCS (AOCS, 1989). Seu resultado foi expresso pela porcentagem de ácido oleico.

Procedimento:

Pesaram-se $28,2 \text{ g} \pm 0,1\text{g}$ de amostra em um balão de 250 mL, adicionaram-se 50 mL de álcool etílico (95%, v/v) aquecidos e agregou-se 1 mL de solução alcoólica de fenolftaleína (1%, m/v). Titulou-se com uma solução aquosa de hidróxido de sódio ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$), até a obtenção de um sobrenadante de coloração rosa permanente durante 30 s.

O conteúdo de AGL foi calculado pela Equação 2:

$$\% \text{ de AGL (expresso como oleico)} = \frac{V \times C \times 28,2}{m} \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde: AGL = ácidos graxos livres (%)

V = volume de hidróxido de sódio consumido na titulação da amostra (mL).

C = concentração da solução de NaOH (mol.L⁻¹).

28,2 = fator de conversão para o ácido oleico (M. M. = 282,46 g.mol⁻¹).

m = massa da amostra (g).

4.6.4 Cromatografia em camada delgada (CCD)

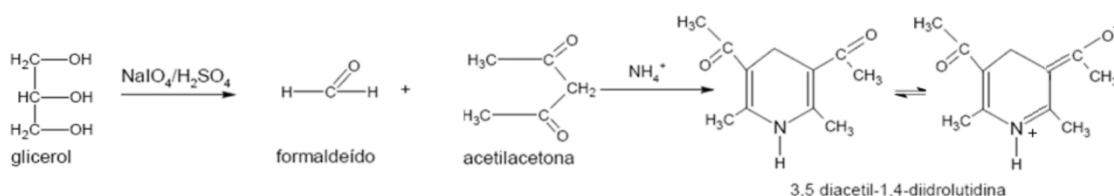
As cinéticas das reações de transesterificação foram seguidas inicialmente por CCD em cromatoplasas (Merck, F₂₅₄). A presença dos ésteres foi visualizada por uma solução reveladora (50% água, 50% etanol, 1% ácido acético, 0,03% azul de Comassie). Antes da análise cromatográfica, as reações de transesterificação foram acompanhadas por CCD, tendo como padrão estearato de etila (Sigma-Aldrich, pureza ≥ 99%). A fase móvel empregada foi *n*-hexano:etil acetato:ácido acético (9:1:0,1). Este método teve por objetivo a verificação qualitativa da conversão em ésteres etílicos durante a reação.

4.6.5 Dosagem de Glicerol

4.6.5.1 Método de Soloni modificado

O glicerol aderido ao sólido fermentado após a reação de transesterificação foi extraído com água destilada (2 g de sólido e 30 mL de água) sob agitação de 200 rpm, 25°C por 15 min. O teor de glicerol no extrato aquoso foi determinado pelo

método de Soloni modificado (MOURA *et al.*, 1998). O fundamento do método baseia-se no seguinte princípio: o glicerol é oxidado a formaldeído, pelo metaperiodato de sódio. O formaldeído resultante reage com acetilacetona, em presença de amônia formando um complexo de cor amarela (3,5-diacetil-1,4 diidrolutidina), que é medido a 410 nm (ESQUEMA 7).



ESQUEMA 7 - REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DO GLICEROL A FORMALDEÍDO COM FORMAÇÃO DO COMPLEXO COLORIMÉTRICO 3,5-1,4-DIIDROLUTIDINA (410 nm), PELO MÉTODO SOLONI-MODIFICADO (MOURA *et al.*, 1998).

Procedimento:

A curva analítica foi obtida a partir de uma solução padrão de glicerol (0,15 mg.mL⁻¹), de onde foram retiradas amostras de 10, 20, 30, 40 e 50 mL. A estes volumes foi adicionada água destilada de modo a obter 250 mL no tubo de ensaio, o que foi seguido da adição de 250 mL do agente oxidante metaperiodato de sódio em H₂SO₄ (0,35 mol.L⁻¹), e 2,5 mL de uma solução contendo acetilacetona. A mistura foi agitada em vórtex e incubada a 56°C durante 10 min, resultando em um complexo amarelo que absorve em 410 nm.

4.6.5.2 Cromatografia de fase gasosa

O teor de glicerol no produto da reação de transesterificação foi determinado por cromatografia gasosa, pela norma BS EN 14105:2003. O método baseia-se na transformação do glicerol em derivados sililados mais voláteis na presença de piridina e N-Metil-N-trimetil-sililtrifluoracetamida, de acordo com a norma BS EN 14105:2003, *British Standards Institution (BSI)* (2003).

Procedimento: pesou-se 100 mg de amostra. Adicionou-se 80 μL de uma solução de butanotriol em piridina (1 mg.mL^{-1}) e 100 μL de uma solução de tricaprina em piridina (8 mg.mL^{-1}) (padrões internos). Então, adicionou-se 100 μL de N-Metil-N-trimetil-sililtrifluoracetamida, sendo o frasco agitado e armazenado por 15 min à temperatura ambiente. Adicionou-se, então, 8 mL de *n*-heptano.

Para análise por cromatografia de fase gasosa, 1 μL da fase orgânica foi injetado em um cromatógrafo gasoso Shimadzu equipado com uma coluna 100% dimetilpolisiloxano de 10 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,1 μm de espessura. As condições de análise foram: detector por ionização em chama, a 380°C , e gás de arraste He. A programação de temperatura foi a seguinte: 1 min a 50°C , 50°C a 180°C ($15^{\circ}\text{C.min}^{-1}$), 180°C a 230°C ($7^{\circ}\text{C.min}^{-1}$), 230°C a 370°C ($10^{\circ}\text{C.min}^{-1}$), 5 min a 370°C .

Utilizou-se como padrões externos o glicerol, monoleína, dioleína e trioleína (Sigma-Aldrich).

4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS INSTRUMENTAIS

4.7.1 Caracterização do óleo de milho

4.7.1.1 Perfil de ácidos graxos das amostras de óleo de milho por derivatização e análise em CG

Para determinar o perfil de ácidos graxos presentes nos dois óleos de milho utilizados neste trabalho (item 4.3), as amostras foram preparadas por derivatização pelo método de trifluoreto de boro (AOAC, método 969.33) e posterior análise em CG, conforme descrito no item 4.7.1.2. Para os cálculos da massa molar de cada óleo de milho utilizado nas reações de transesterificação, utilizou-se como base a composição dos ácidos graxos encontrada por esse método. Os cálculos foram feitos a partir da percentagem dos ésteres metílicos dos ácidos graxos presentes no óleo, relacionada com suas respectivas massas molares.

Procedimento:

Adicionaram-se 300 mg da amostra de óleo de milho a um balão e algumas pérolas de vidro previamente desengorduradas. Foram adicionados 4 mL de NaOH ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$) e conectou-se o condensador ao balão, que foi deixado em banho-maria a 75°C por 12 min. Passado esse tempo, adicionou-se pela parte superior do condensador 5 mL de trifluoreto de boro; então, o meio foi mantido em banho-maria por mais 2 min. Adicionaram-se 3 mL de *n*-heptano e o balão permaneceu no banho por mais 1 min. Retirou-se o balão, que foi resfriado em água corrente, agitando-o manualmente, e adicionaram-se 20 mL de uma solução saturada de NaCl para separar a fase orgânica do meio. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, coletou-se uma porção da fase orgânica para posterior análise por CG (4.7.1.2).

4.7.1.2 Análise de amostras provenientes de reações de transesterificação por Cromatografia de Fase Gasosa

4.7.1.2.1 Quantificação do teor de éster nas amostras por padronização externa

Todas as amostras derivadas das reações de transesterificação realizadas no CIATEJ (México) foram analisadas de acordo com a metodologia descrita a seguir.

O teor de éster nas amostras provenientes das reações de etanolise do óleo de milho foi quantificado por padronização externa. Para o cálculo da concentração de ésteres na amostra, utilizou-se uma curva analítica com os padrões dos ésteres etílicos dos seguintes ácidos graxos: láurico, palmítico, esteárico e oleico (Sigma-Aldrich). Foram realizadas curvas analíticas para cada um dos quatro ésteres, sendo a curva feita a partir de uma solução-mãe contendo 50 mg do padrão de éster etílico em 1 mL de *n*-hexano com diluições até $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$. O cálculo da curva analítica se deu pela relação entre a concentração dos ésteres e a área dos picos apresentadas no cromatograma.

Ao final de cada reação, 100 μL de amostra foram diluídos em 900 μL de *n*-hexano (grau HPLC) e analisados por CG em cromatógrafo de fase gasosa HP (Hewlett-Packard), modelo HP 6980 com detector de ionização de chama (CG/FID). A coluna capilar utilizada, modelo HP5, tinha as seguintes características: 0,32 mm de

diâmetro interno, 30 m de comprimento e 0,25 µm de filme líquido. A temperatura do injetor foi de 250°C, relação split = 50/1 e a quantidade de amostra injetada igual a 0,2 µL. O gás de arraste utilizado foi o hélio e a temperatura do detector FID de 300°C com programação de temperatura do forno de 5°C.min⁻¹ até 300°C, com tempo inicial de 1 min. O fluxo do gás de arraste utilizado foi de 2 mL.min⁻¹, H₂ = 40 mL.min⁻¹, O₂ = 400 mL.min⁻¹. O tempo total da corrida foi de 25 minutos.

O teor de éster nas amostras derivadas das reações de transesterificação realizadas nesta etapa do trabalho foi calculado pela equação 3:

$$C (\%) = \frac{(mM_{\text{totais}} \text{ de ésteres etílicos} \times 100)}{(3 \times mM_{\text{totais}} \text{ de triacilglicerídeos)}} \quad \text{(Equação 3)}$$

Onde: C = concentração de éster na amostra (%).

mM_{totais} = concentração (em ésteres etílicos ou TAGs) (mmol.L⁻¹).

4.7.1.2.2 Quantificação do teor de éster nas amostras por padronização interna

Essa metodologia de análise foi utilizada na quantificação do teor de éster das amostras referentes à parte experimental realizada no LTEB/UFPR. Todas as análises cromatográficas referentes a esta etapa foram realizadas no Laboratório de Análise de Combustíveis Automotivos da UFPR (LCAUT).

Para a análise, a amostra foi seca com sulfato de sódio anidro e centrifugada por 10 min a 3000xg. Em um vial, 0,05 g de amostra foram diluídos em 1 mL da solução do padrão interno heptadecanoato de metila (Sigma-Fluka, pureza 99,8%) em *n*-heptano (10 mg.mL⁻¹). As amostras foram analisadas em cromatógrafo de fase gasosa Varian, modelo CP 3800 com detector FID equipado com coluna capilar Chrompack de sílica fundida CP-SIL 5 CB (100% dimetilpolisiloxano), com 0,32 mm de diâmetro interno, 60 m de comprimento e 1,00 µm de filme líquido. A temperatura do injetor foi de 250°C, a relação *split* de 5/1 a 100/1, e a quantidade de amostra injetada igual a 1,0 µL. O gás de arraste utilizado foi o hélio, a temperatura do detector FID de

300°C com programação de temperatura do forno: temperatura inicial de 250°C, permanecendo por 10 min, elevação a 280°C na razão de 20°C/min, permanecendo por 15 min. Fluxo do gás de arraste de 1 a 1,5 mL.min⁻¹ com pressão constante de 20 psi. O tempo total da corrida foi de 26 min.

Nesta etapa do trabalho, o teor de éster em cada amostra (C) foi calculado pela equação 4:

$$C (\%) = \frac{\Sigma A - A_{PI}}{A_{PI}} \times \frac{PI \text{ (mg.mL}^{-1}\text{)} \times V_{PI} \text{ (mL)}}{m_{amostra}} \times 100 \quad \text{(Equação 4)}$$

Onde: C = porcentagem de éster na amostra.

ΣA = soma das áreas dos picos.

A_{PI} = área do pico do padrão interno.

PI = concentração do padrão interno (mg.mL⁻¹).

V_{PI} = volume do padrão interno (mL).

$m_{amostra}$ = massa da amostra utilizada da análise (g).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE MILHO UTILIZADO NAS REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO

5.1.1 Caracterização físico-química

Os ensaios de caracterização foram realizados para os diferentes óleos de milho comerciais utilizados nas duas etapas deste trabalho, o óleo utilizado no CIATEJ (Guadalajara, México) e aquele utilizado em reações no LTEB/UFPR (Curitiba, Brasil).

Como mostra a Tabela 2, os dois óleos apresentaram características semelhantes. As características observadas para os óleos de milho estão dentro do limite descrito pela literatura e validam a sua utilização nas reações de transesterificação (GOERING *et al.*, 1982).

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS ÓLEOS DE MILHO UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO.

	LTEB/UFPR	CIATEJ	^b Literatura
^a AGL (% ácido oleico, m/m)	0,075 ± 0,001	0,073 ± 0,003	0,11
Umidade (% m/m)	Traços	0,264 ± 0,191	Traços
Densidade (g/mL)	0,939 ± 0,012	0,931 ± 0,013	0,9095

^a AGL: Ácidos graxos livres

^b Goering *et al.*, (1982).

É importante salientar que, no caso da catálise enzimática, a presença de ácidos graxos livres não afeta o rendimento da reação, uma vez que as enzimas são capazes de conduzir a reação de esterificação direta (LEE, FOGLIA e CHANG, 2002). Esta é uma vantagem em relação ao processo químico, no qual se empregam catalisadores básicos, onde a presença de ácidos graxos livres no óleo afeta de maneira significativa o rendimento da reação.

5.1.2 Determinação da composição em ácidos graxos

O perfil de ácidos graxos dos dois óleos de milho foi determinado por cromatografia de fase gasosa pela análise dos respectivos ésteres metílicos, utilizando-se como derivatização o método do trifluoreto de boro, conforme descrito em materiais e métodos (4.3.4). A partir da composição centesimal em ácidos graxos multiplicando-se por suas respectivas massas molares, foi possível calcular a massa molar dos óleos de milho. Este é um dado importante para o cálculo da porcentagem de conversão dos TAGs do óleo em seus ésteres. O perfil de ácidos graxos para o óleo de milho utilizado no CIATEJ está de acordo com os dados da literatura (GOERING, 1982), porém, para o óleo de milho utilizado no LTEB, existem algumas diferenças, principalmente no teor encontrado para os ácidos esteárico e linolênico (TABELA 3).

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS DOS ÓLEOS DE MILHO UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO.

Óleo de milho			
Ácido Graxo	LTEB	CIATEJ	^a Literatura
	(%, m/m)	(%, m/m)	(%, m/m)
Palmítico (16:0)	14,8	11,8	11,7
Estearico (18:0)	8,8	2,1	1,8
Oleico (18:1)	31,8	30,1	25,2
Linoleico (18:2)	37,9	55,1	60,6
Linolênico (18:3)	6,7	0,8	0,5

^a Goering *et al.* (1982).

Observa-se que a composição em ácido oleico é similar para os dois óleos, mas há diferenças significativas com os dados reportados por Goering *et al.* (1982), como também entre os dois óleos utilizados, o que pode ser justificado, pela variação da composição química de um mesmo tipo de óleo vegetal de acordo com a variedade da semente, época de colheita, técnica de processamento, condições climáticas e de solo.

Os dados do perfil de ácidos graxos apresentados na Tabela 3 foram utilizados para o cálculo das massas molares dos dois óleos. A massa molar do óleo de milho utilizado no CIATEJ (Guadalajara, México) calculada a partir deste perfil foi

de 912,30 g.mol⁻¹ e para o óleo de milho utilizado no LTEB, foi de 909,24 g.mol⁻¹.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO

5.2.1 Atividade de hidrólise

A fim de escolher o melhor substrato para a resposta da atividade hidrolítica da lipase contida no sólido fermentado, foram testados três diferentes TAGs: Tributirina (C₄), Tricaprilina (C₈) e Trioleína (C₁₈). Como mostra a Tabela 4, a melhor resposta foi obtida com a tricapriline, e dessa forma esse foi o substrato utilizado nas determinações da atividade de hidrólise da lipase.

TABELA 4 - PERFIL DE ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DA LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM CONTIDA NO SÓLIDO FERMENTADO.

Substrato	* Atividade de hidrólise (U/gSS)
Tributirina (C ₄)	44,2 ± 2,5
Tricaprilina (C ₈)	77,0 ± 3,0
Trioleína (C ₁₈)	38,2 ± 2,4

* Método titulométrico (4.3.1).
Temperatura da análise = 37°C.

O perfil de atividade de hidrólise apresentado pela lipase de *R. microsporus* (Tabela 4) está de acordo com os reportados por Alberton *et al.* (2010) e confirma a presença de lipases verdadeiras no sólido, uma vez que lipases verdadeiras por definição apresentam a capacidade de hidrolisar TAGs de cadeia longa (acima de 10 átomos de carbono) (BORNSCHEUER *et al.*, 2002).

5.2.2 Estabilidade ao armazenamento

A estabilidade do sólido fermentado armazenado a 4°C está mostrada na Figura 6, em termos de atividade residual.

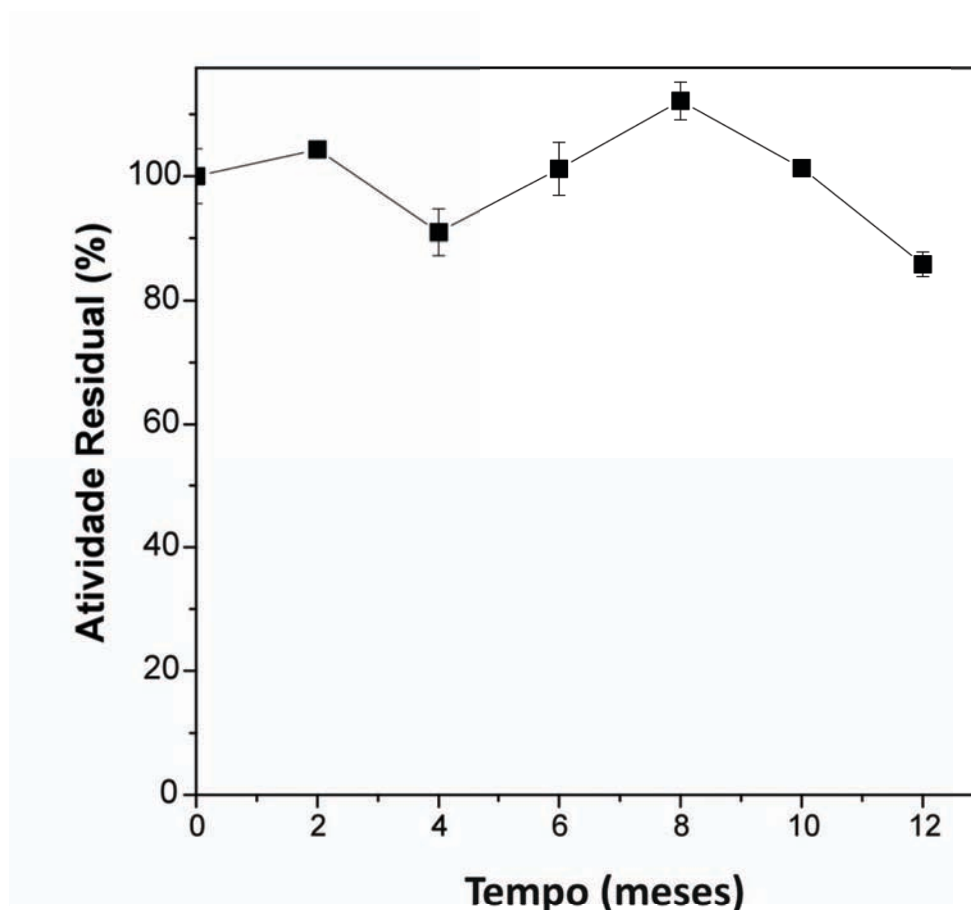


FIGURA 6 - ESTABILIDADE DO SÓLIDO FERMENTADO ($a_w = 0,55$) CONTENDO A LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM ARMAZENADO A 4°C. A ATIVIDADE DE HIDRÓLISE FOI DETERMINADA PELO MÉTODO TITULOMÉTRICO; SUBSTRATO: TRICAPRILINA.

Observa-se que, durante os 10 primeiros meses, a atividade inicial (91 U/gSS) foi mantida em torno de 90 ± 4 U/gSS (99% de atividade residual). Somente após 12 meses de armazenamento a lipase apresentou uma perda de $15 \pm 1\%$ de sua atividade inicial. Outro fator de grande influência na manutenção da atividade da lipase armazenada é o baixo valor de atividade de água encontrado para o sólido fermentado após a liofilização ($a_w = 0,55$), pois nestes valores de a_w o crescimento microbiano é minimizado (RÜKOLD, GROBECKER e ISENGARD, 2001).

5.2.3 Efeito do tamanho das partículas do sólido fermentado seco

A heterogeneidade do bagaço de cana utilizado nos cultivos vinha resultando em baixa reprodutibilidade das análises e das reações empregando a lipase. Com o intuito de resolver esse problema, foi feito um teste de dosagem da atividade lipolítica das frações do sólido fermentado separadas por tamanho. Os dados de atividade da lipase nas diferentes porções do sólido fermentado peneirado estão na Tabela 5.

TABELA 5 - ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DA LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM NAS DIFERENTES FRAÇÕES DO SÓLIDO FERMENTADO.

Tamanho (mesh)	^a Atividade de hidrólise (U/gSS)	Massas das frações (%, m/m)
< 6	69	11,4
6 - 8	88	7,5
8 - 18	132	37,2
18 - 30	144	20,5
30 - 40	144	12,5
> 40	252	11

^a Sólido fermentado peneirado.

Avaliando os dados mostrados na Tabela 5, nota-se que as porções do sólido com diâmetros menores são aquelas cujas atividades são mais elevadas (de 144 a 252 U/gSS). Provavelmente isto se deve à maior área superficial destas partículas, capaz de imobilizar maior número de moléculas de lipase.

Além disso, a mais alta atividade encontrada nas frações mais finas poderia ser devida à imobilização da lipase sobre a sílica presente no bagaço de cana, uma vez que análises da composição centesimal revelaram que o bagaço de cana apresentou um teor de cinzas de 2,04%, constituído basicamente de sílica, SiO₂ (CORDEIRO *et al.*, 2008; DE PAULA *et al.*, 2008). Assim, sendo a sílica presente no bagaço de cana pode servir como um suporte para a lipase, uma vez que a maioria das enzimas possui uma superfície hidrofílica (FESSNER e ANTHONSEN, 2009), sendo imobilizadas pela formação de ligações de hidrogênio com moléculas polares, como no caso da sílica. No entanto, grânulos muito finos prejudicavam a coleta de alíquotas do sobrenadante e a recuperação do sólido ao final da reação e também não são interessantes para a utilização da lipase em biorreator de leito fixo, visto que há

maior possibilidade de empacotamento do leito. Assim, novos estudos foram feitos no sentido de otimizar o tamanho das partículas.

5.2.4 Efeito do tamanho das partículas do bagaço de cana antes dos cultivos

Além do efeito do tamanho das partículas do sólido após a fermentação, foi verificado o efeito da classificação dos substratos antes dos cultivos e os resultados foram comparados com os do sólido fermentado não classificado e moído (em liquidificador) após a fermentação e secagem. Foram comparadas as seguintes condições: (a) com e sem peneiramento do bagaço de cana antes da fermentação, (b) moagem do sólido após a fermentação e secagem (sólido não classificado). As condições testadas estão descritas na Tabela 6.

TABELA 6 - EFEITO DA MOAGEM DOS SUBSTRATOS NA ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DA LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM NO SÓLIDO FERMENTADO.

Condições	Atividade de hidrólise (U/gSS)
Bagaço de Cana: Peneirado antes da fermentação (frações entre 8 a 20 mesh)	88 ± 1,3
^a Não Peneirado	77 ± 10
^a Sólido fermentado: Moído após a fermentação (frações entre 8 a 40 mesh)	120 ± 4,2

^a Bagaço de cana não peneirado antes dos cultivos.

A maior atividade foi obtida para o sólido moído após os cultivos (120 ± 4,2 U/gSS). Portanto, para os experimentos seguintes passou-se a moer o sólido depois dos cultivos.

Os resultados apresentados na Tabela 6 apontam para uma maior atividade de hidrólise da lipase no sólido moído em liquidificador após a fermentação. Isso pode ser explicado pelo aumento da área superficial de contato entre sólido e o meio reacional, com diminuição dos efeitos de limitação difusional. Desta forma, passou-se a moer o sólido seco após as fermentações.

5.2.5 Efeito da temperatura

A temperatura é um fator-chave nas reações enzimáticas. Altas temperaturas podem desnaturar a lipase, porém, a reação pode levar muito tempo para atingir o equilíbrio em baixas temperaturas (QIN *et al.*, 2008). A dependência da temperatura na atividade da lipase de *R. microsporus* foi investigada pela hidrólise da tricaprilina (C₈) (Tabela 7).

TABELA 7 - EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE HIDROLÍTICA DA LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM CONTIDA NO SÓLIDO FERMENTADO.

Temperatura (°C)	* Atividade (U/gSS)
30	52 ± 2
37	91 ± 1
40	81 ± 4
45	82 ± 2
50	75 ± 1
60	70 ± 1

Os dados apresentados na Tabela 7 mostram que o intervalo de temperatura ótima para a atividade da lipase foi entre 37 e 45°C, com atividade máxima entre 82 ± 2 e 91 ± 1 U/gSS. Quando se eleva a temperatura para 50°C, a atividade enzimática decresce para 75 ± 1 U/gSS, e continua a diminuir com o aumento da temperatura, mas ainda mantém cerca de 70% de sua atividade máxima (91 U/gSS) a 60°C.

Diaz *et al.* (2006) estudaram a estabilidade térmica da lipase *Rhizopus homothallicus* produzida por FES, dosando a atividade residual da lipase em função do tempo, apresentando atividade máxima em 40°C. Hiol *et al.* (2000) e Kohno *et al.* (2000) estudaram a termoestabilidade das lipases de *R. oryzae* e *R. niveus*, respectivamente, e observaram que as enzimas apresentaram atividade máxima em uma faixa de 30°C a 40°C, no entanto, foram gradativamente inativadas a partir de 45°C perdendo sua atividade com o aumento da temperatura. Este efeito também foi observado na resposta da atividade de hidrólise para a lipase de *R. microsporus* neste trabalho.

Dessa forma, como uma das vantagens da catálise enzimática é a possibilidade de se trabalhar em temperaturas mais baixas, e a fim de evitar a desnaturação da lipase pelo aumento da temperatura, optou-se por estudar as reações seguintes em temperaturas inferiores a 45°C.

5.3 OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS POR ESTERIFICAÇÃO

5.3.1 Estudos preliminares

Inicialmente, para avaliar o desempenho da lipase em reações de síntese em meio orgânico, foi realizado um estudo seguindo-se a cinética de síntese de ésteres etílicos pelo desaparecimento do ácido graxo no meio pelo método de Lowry-Tinsley (LOWRY e TINSLEY, 1976). Foram utilizados como substratos o ácido oléico (pureza 58%) e o etanol (pureza 99,5%) numa razão molar de 1:5 (ácido:etanol). Por se tratar de um experimento inicial, utilizou-se um sólido fermentado cuja atividade ainda não tinha sido otimizada e as condições de reação foram as mesmas já otimizadas por Fernandes *et al.* (2007) para a lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 produzida por FES. A reação foi realizada utilizando 1,0 g de sólido fermentado (atividade de hidrólise de 54 U/gSS), em *n*-heptano (FIGURA 7).

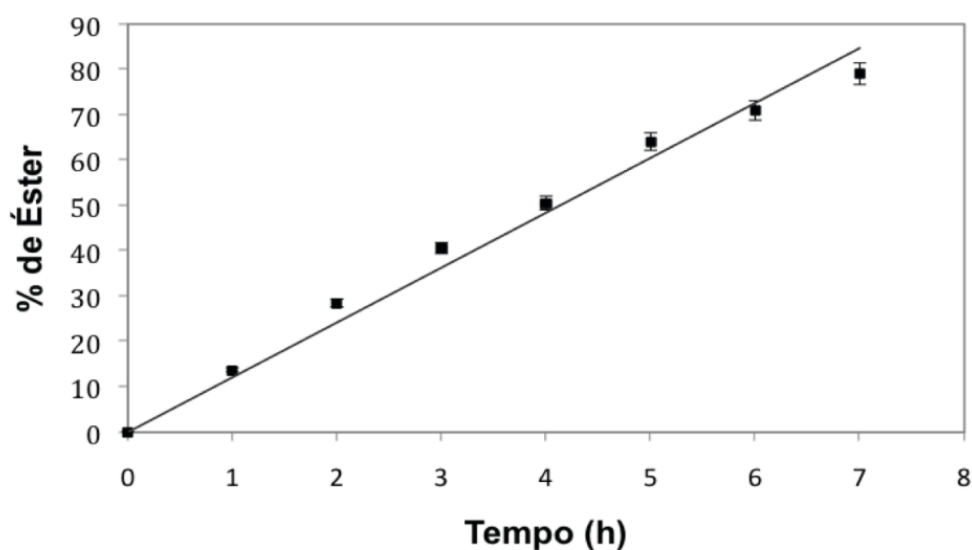


FIGURA 7 - CINÉTICA DA SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS, CATALISADA PELA LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM PRODUZIDA POR FES (54 U.g⁻¹ DE SÓLIDO SECO, 1,0 g DE SÓLIDO FERMENTADO); RAZÃO MOLAR 1:5 (ÁCIDO:ÁLCOOL), 37°C EM *n*-HEPTANO.

Como mostra a Figura 7, a porcentagem de conversão em éster foi de $79 \pm 3\%$ em 7 h de reação, correspondendo a uma produtividade de 30 mg/h.g_{catalisador}. A atividade de esterificação da lipase foi de 2,4 U/gSS, calculada a partir da velocidade

inicial da reação e expressa em $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de éster formado por minuto e por grama de sólido seco.

Foi realizado um controle negativo, substrato não fermentado. Os resultados mostraram que não houve conversão em éster, confirmando a atividade catalítica da lipase de *R. microsporus*.

5.3.2 Efeito da razão molar dos substratos

A maior parte dos estudos feitos sobre a síntese de ésteres de biodiesel por via enzimática a partir de óleos vegetais tem sido o efeito da razão molar do álcool (AL-ZUHAIR, LIG e JUN, 2007). Este efeito está mostrado na Figura 8, para a síntese de ésteres etílicos por esterificação.

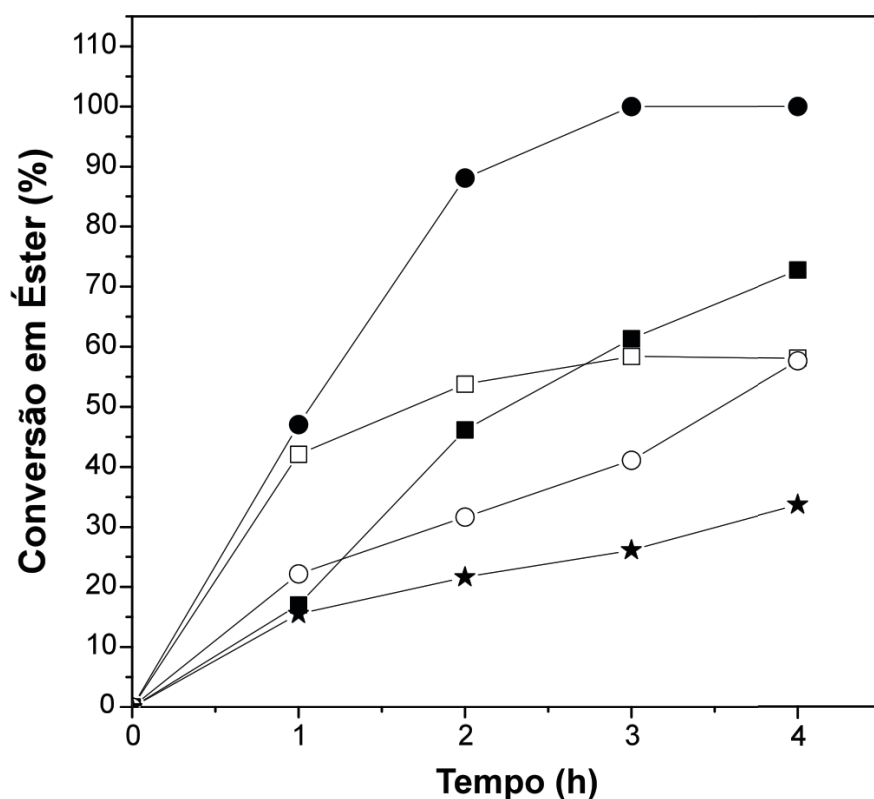


FIGURA 8 – EFEITO DA RAZÃO MOLAR DOS SUBSTRATOS NA SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS POR ESTERIFICAÇÃO, EM *N*-HEPTANO, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 (UNIDADES ENZIMÁTICAS TOTAIS = 120 U). RAZÃO MOLAR (ÁCIDO:ÁLCOOL) = (□) 1:1; (●) 1:3; (■) 1:5; (○) 1:10; (★) 1:15. Condições de reação: 30°C, 180 rpm.

Observou-se (FIGURA 8) que a melhor razão molar foi a 1:3 ácido:álcool (superior a 98% de conversão, 3 h), e que todas as razões molares com aumento da concentração do etanol no meio reacional proporcionaram menor conversão em éster no mesmo intervalo de tempo (61, 41 e 26%, razão molar ácido:álcool 1:5, 1:10 e 1:15, respectivamente). Isso comprova as afirmações feitas anteriormente (YU *et al.*, 2007; STRAATHOF e ADLERCEUTZ, 2000), quando os autores reportam a toxicidade do etanol na atividade de enzimas. Além disso, é interessante notar que a razão molar 1:1 também causou uma baixa conversão (54% em 2 h). Isto provavelmente ocorre porque, para que a reação seja favorável, é requerido um aumento da razão álcool/ácido para além da estequiometria da reação, para deslocar o equilíbrio termodinâmico da reação em favor da síntese do éster (SINGH e SINGH, 2010; HERNÁNDEZ-MARTÍN *et al.*, 2008; SINHA, AGARWAL e GARG, 2008; AKOH *et al.*, 2007; MARCHETTI, MIGUEL e ERRAZU, 2007; MA e HANNA, 1999; SCHUCHARD *et al.*, 1998).

Quando solventes polares são utilizados no meio reacional, a atividade enzimática é reduzida, provavelmente pelos efeitos de inibição competitiva, como é o caso do etanol (AL-ZUHAIR, LIG e JUN, 2007; YADAV e DEVI, 2004), onde ocorre a ligação de moléculas do solvente ao sítio ativo da enzima, ou, por desnaturação da enzima. Segundo Yu *et al.* (2007), a desnaturação pode ser explicada da seguinte forma: quando a reação é realizada na presença de solventes polares, esse tipo de solvente (hidrofílico) pode perturbar a estrutura funcional da enzima por retirar sua camada de “água essencial”, cuja função é preservar a conformação molecular correta da enzima, minimizando ou até interrompendo suas funções essenciais. As moléculas de água apresentam maior afinidade pela ligação com o solvente polar do que por ligar-se à enzima, diminuindo sua flexibilidade conformacional, uma vez que a água serve como uma espécie de lubrificante da estrutura da enzima (STRAATHOF e ADLERCEUTZ, 2000). Além disso, a forte interação do solvente polar com a enzima pode resultar em uma variação da conformação do sítio ativo, inativando ou desnaturando a enzima.

5.3.3 Otimização das condições de síntese por delineamento fatorial

Depois de realizados os ensaios preliminares de síntese de ésteres etílicos, as condições da reação de esterificação foram otimizadas por delineamento fatorial (2^3 com triplicata no ponto central), estudando-se os efeitos dos parâmetros temperatura

(X_1), razão molar ácido:álcool (X_2) e unidades totais de enzima adicionadas ao meio (X_3). Os níveis adotados para cada variável foram: $X_1 = 30, 37$ e 44°C ; $X_2 = 1:1, 1:3$ e $1:5$; $X_3 = 60, 90$ e 120 U. Como variáveis-resposta, foram determinadas a conversão em éster e a atividade de esterificação da lipase a partir das velocidades iniciais da reação. Todas as reações foram acompanhadas durante 6 h, retirando-se alíquotas em intervalos de 1 h. A Tabela 8 apresenta os resultados experimentais do delineamento fatorial, bem como as variáveis e níveis estudados.

TABELA 8 - DELINEAMENTO FATORIAL 2^3 APLICADO NO ESTUDO DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO UTILIZANDO A LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM CONTIDA NO SÓLIDO FERMENTADO: VARIÁVEIS, NÍVEIS, E RESULTADOS EXPERIMENTAIS.

Variáveis	Níveis		
	Inferior (-1)	Médio (0)	Superior (+1)
X_1 - Temperatura ($^\circ\text{C}$)	30	37	44
X_2 - Razão molar (ácido:etanol)	1:3	1:5	1:7
X_3 - Unidades Enzimáticas Totais (U)	60	90	120

Experimento	X_1	X_2	X_3	^a Éster (%)	^b Atividade de Esterificação (U/gSS)
1	-1	-1	-1	56	4,1
2	-1	-1	+1	> 98%	5,6
3	-1	+1	+1	61	2,6
4	+1	+1	+1	72	3,1
5	+1	+1	-1	35	2,9
6	+1	-1	-1	69	3,2
7	-1	+1	-1	27	2,9
8	+1	-1	+1	> 98%	5,7
9	0	0	0	62	3,5
10	0	0	0	65	3,6
11	0	0	0	63	3,4

O desvio padrão calculado para o ponto central foi de $\pm 1,91$.

A concentração inicial de ácidos graxos em cada experimento foi de 70 mmol.L^{-1} .

Atividade hidrolítica da lipase = 91 U/gSS .

^a Conversão em éster após 3 h de reação.

^b Quantidade de enzima capaz de promover o consumo de $1 \mu\text{mol}$ de ácido oleico por min, nas condições de cada experimento.

A Tabela 9 apresenta os efeitos das variáveis, calculados a partir dos dados experimentais da Tabela 8. A partir dos resultados obtidos para o ponto central (TABELA 8, experimentos 9-11), foi possível calcular o desvio padrão para a conversão em éster, que foi de $\pm 1,91$ e, de $\pm 0,1$ para a resposta atividade de esterificação (TABELA 9), que também são válidos para as demais respostas do delineamento (BRUNS, BARROS NETO e SCARMINO, 1996). Um efeito será tanto

mais significativo, quanto maior for a diferença entre o desvio-padrão obtido e o valor encontrado para o efeito.

TABELA 9 - VALORES DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS PRINCIPAIS E SECUNDÁRIAS DO DELINEAMENTO FATORIAL SOBRE AS VARIÁVEIS-RESPOSTA (PORCENTAGEM DE CONVERSÃO EM ÉSTER E ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO) DA SÍNTESE CATALISADA PELA LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM CONTIDA NO SÓLIDO FERMENTADO.

Variáveis	Efeitos (p.p.) ^a Conversão em Éster (%)	Efeitos (p.p.) ^a Atividade de Esterificação (U/gSS)
T (°C)	+ 8 ± 1,91	- 0,1 ± 0,1
^b RM	- 32 ± 1,91	- 1,8 ± 0,1
^c Unidades Enzimáticas Totais (U)	+ 36 ± 1,91	+ 0,9 ± 0,1
T x U	- 3 ± 1,91	+ 0,4 ± 0,1
T x RM	+ 1 ± 1,91	+ 0,3 ± 0,1
U x RM	- 1 ± 1,91	- 1,0 ± 0,1
T x U x RM	+ 4 ± 1,91	- 0,1 ± 0,1

^a p.p. = Pontos percentuais.

^b RM: razão molar ácido oleico:etanol.

^c Unidades Enzimáticas Totais (U) = quantidade de enzima utilizada nos experimentos.

DP (desvio padrão) = ± 1,91 (variável-resposta: conversão em éster).

DP (desvio padrão) = ± 0,1 (variável-resposta: atividade de esterificação).

Os resultados apresentados na Tabela 9 foram então utilizados para a montagem do gráfico (FIGURA 9), que mostra o efeito das variáveis. Os resultados do delineamento foram interpretados em função das duas variáveis-resposta: atividade de esterificação (5.3.3.1) e conversão em éster (5.3.3.2).

Em primeira análise, é possível observar que apenas duas variáveis (Unidades Totais e RM) apresentaram influência nas respostas monitoradas, pois os valores dos efeitos foram superiores (+ 0,9 e - 1,8, respectivamente) ao desvio padrão característico das correspondentes variáveis-resposta (± 0,1) (TABELA 9). A temperatura (X₁) não apresentou efeito significativo, quando avaliada isoladamente (- 0,1 ± 0,1). O efeito individual mais significativo (- 1,8 ± 0,1) foi o parâmetro X₂ ou “Razão molar”, que representa a quantidade de etanol utilizada em relação a concentração de ácido. Este efeito foi negativo, como já era de se esperar, pois, quantidades muito elevadas de álcool tendem a inibir ou até mesmo desnaturar a enzima, reduzindo assim sua atividade catalítica (YU *et al.*, 2007; STRAATHOF e ADLERCEUTZ, 2000), neste caso, a atividade de esterificação. Quando a razão ácido:etanol passa de 1:3 (nível menos) para 1:7 (nível mais), verifica-se um queda de 1,8 pontos percentuais no rendimento da reação. Desta forma, a atividade de esterificação da lipase é máxima, quanto menor for a quantidade de etanol no meio (respeitando a estequiometria da reação).

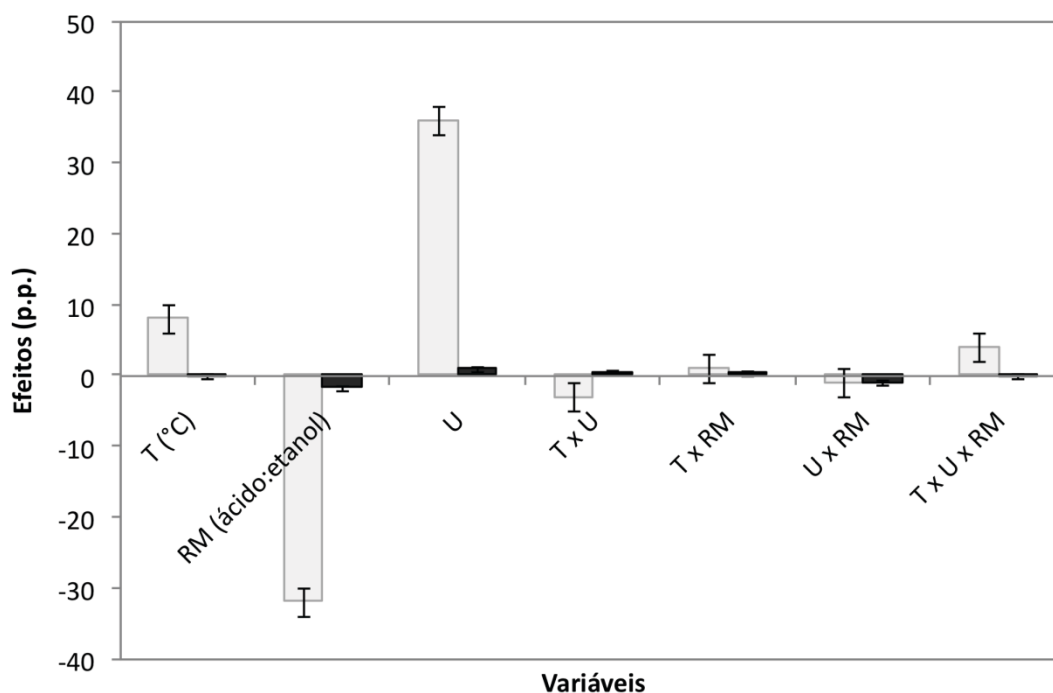


FIGURA 9 – EFEITOS DAS VARIÁVEIS PRINCIPAIS E SECUNDÁRIAS SOBRE AS RESPOSTAS DO DELINEAMENTO FATORIAL APLICADO À SÍNTESE DE ÉSTERES POR ESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07. VARIÁVEIS-RESPOSTA: (□) PORCENTAGEM DE CONVERSÃO EM ÉSTER; (■) ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO. Condições: 3 h de reação, 180 rpm.

5.3.3.1 Variável-resposta: Atividade de esterificação (U/gSS)

O segundo parâmetro em importância foi a quantidade de unidades enzimáticas totais ($U - X_3$), significativo em $+ 0,9 \pm 0,1$. Quando X_3 é mudada do nível menos (60 U) para o nível mais (120 U), o sistema apresenta um aumento de 0,9 pontos percentuais no rendimento, como esperado. Desta forma, para maximizar a resposta, levando-se em consideração apenas o parâmetro X_3 , valores elevados são recomendados.

Analisando-se os efeitos secundários, ou seja, aqueles resultantes da interação entre duas variáveis, verificam-se um valor mais expressivo ($- 1,0 \pm 0,1$) para a interação U x RM. Para as interações T x U e T x RM, os efeitos foram positivos ($+ 0,4$ e $+ 0,3$, respectivamente), a influência destes efeitos secundários pode ser explicada principalmente pela colaboração positiva das variáveis U e RM, já que o aumento da temperatura não teve grande influência na atividade de esterificação da lipase.

As diferenças entre os efeitos das variáveis para as duas respostas do delineamento fatorial (conversão em éster e atividade de esterificação) podem ser explicadas pelo fato de a atividade de esterificação ser um parâmetro que envolve apenas a velocidade inicial da reação, já a conversão foi calculada para um intervalo de tempo fixo (3 h).

5.3.3.2 Variável-resposta: Conversão em Éster (%)

Em primeira análise, na Figura 9 é possível observar que todas as variáveis (Temperatura, Unidades Enzimáticas Totais e Razão Molar) apresentaram influência no rendimento da reação, pois os valores dos efeitos foram superiores (+ 8; + 36 e - 32) ao desvio padrão característico das correspondentes variáveis-resposta ($\pm 1,91$).

O efeito individual mais significativo (+ 36) foi o parâmetro “Unidades Enzimáticas Totais”, que representa a quantidade de enzima utilizada no experimento. Quando este parâmetro passa de 60 U (nível inferior) para 120 U (nível superior), verifica-se um aumento de 36 pontos percentuais (p.p.) no rendimento da reação. Desta forma, para maximizar a resposta, levando-se em consideração apenas o parâmetro U, altos valores são recomendados.

O segundo parâmetro em importância foi a razão molar (ácido:álcool), X_2 , significativo em - 32. Ou seja, quando a razão molar é alterada do nível menos (1:3) para o nível mais (1:7), o sistema apresenta um decréscimo médio de 32 pontos percentuais no rendimento. Desta forma, para maximizar a resposta, levando-se em consideração apenas o parâmetro razão molar, valores baixos são recomendados. Como já verificado antes na Figura 8 (item 5.3.2) um aumento da quantidade de álcool na razão molar ácido:etanol causa desnaturação da lipase por remoção da água de solvatação da enzima, responsável pela manutenção da sua conformação cataliticamente ativa ou por inibição competitiva do etanol (NOUREDDINI, GAO e PHILKANA, 2005; SHIMADA *et al.*, 2002).

Dentre os efeitos principais, a temperatura foi o que apresentou a menor influência na reação de síntese catalisada pela lipase, dentro da faixa estudada. Apesar de o efeito ser positivo (+ 8), quando comparado aos outros (U, + 36 e RM, - 32), não apresenta grande relevância na formação do éster, ou seja, o aumento da temperatura do nível menos (30°C) para o nível mais (44°C), causa um acréscimo de apenas 8 pontos percentuais no rendimento da reação. Isso significa que a lipase de *R. microsporus* é um eficiente biocatalisador desse tipo de reação, uma vez que pode

sintetizar o éster até mesmo em temperaturas amenas (30°C).

Ainda na Figura 9, analisando-se os efeitos de segunda ordem, ou seja, aqueles resultantes da interação entre duas variáveis, verificam-se valores menos expressivos para os três tipos de interação. O efeito secundário mais importante foi o da interação entre Razão Molar e Temperatura (- 3). Para as interações Temperatura x Unidades Enzimáticas Totais e Temperatura x Razão Molar, o efeito sinérgico foi irrelevante (+ 1 e - 1, respectivamente), já que foram inferiores ao desvio padrão ($\pm 1,91$). Isso significa que a variável X_3 (U) pode ser interpretada isoladamente, porque não há interação desse fator com os demais, ou seja, sua contribuição de 36 pontos percentuais positivos no rendimento da reação não depende dos níveis das outras variáveis, na faixa experimental estudada (BRUNS, BARROS NETO e SCARMINO, 1996). Para facilitar esta análise, uma representação geométrica do sistema, envolvendo as variáveis e suas respostas, é apresentada na Figura 10.

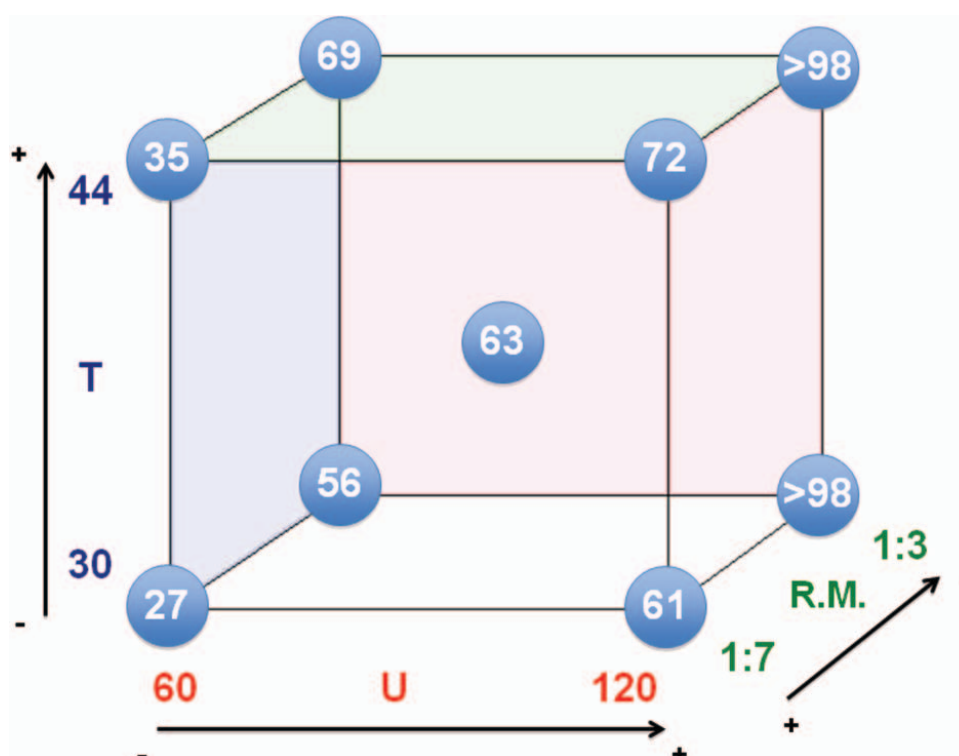


FIGURA 10 - EFEITO DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NO DELINEAMENTO FATORIAL 2^3 NO RENDIMENTO DA SÍNTESE DOS ÉSTERES ETÍLICOS, POR ESTERIFICAÇÃO, UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM PRODUZIDA POR FES. VARIÁVEIS: T – TEMPERATURA. X_1 (30°C, NÍVEL – E 44°C, NÍVEL +); R.M. – RAZÃO ÁCIDO:ÁLCOOL EM EQUIVALENTES MOLARES – X_2 (3, NÍVEL – E 7, NÍVEL +) E U – QUANTIDADE DE ENZIMA – X_3 (UNIDADES ENZIMÁTICAS TOTAIS, 60 U, NÍVEL – E 120 U, NÍVEL +). Condições: 3 h de reação, 180 rpm.

Avaliando-se a tendência das respostas, verificam-se no cubo da Figura 10 dois pontos de máxima ($> 98\%$ para os vértices posteriores direitos, superior e inferior), que podem ser atingidos com o máximo de enzima no meio (120 U), razão molar 1:3 (ácido:álcool) e temperaturas de 30 e 44°C. Porém, quando se avalia a influência da temperatura, apesar de não ser tão representativo como os outros dois parâmetros (X_2 e X_3), pode-se dizer que se elevando a temperatura a eficiência da reação é ligeiramente aumentada. Porém, sabe-se que a redução dos custos energéticos é uma das justificativas da catálise enzimática, e levando-se em conta que foi possível atingir o rendimento máximo da reação a 30°C, esta foi a condição de temperatura escolhida para a reação de esterificação.

Em conclusão, as melhores condições para a produção do éster obtidas a partir do delineamento fatorial foram 30°C, razão molar ácido:álcool de 1:3 e 120 U, com um rendimento de mais de 98% em um tempo de conversão de éster menor (3 h) quando comparado com os resultados anteriores (7 h e $79 \pm 3\%$, item 3.3.1). Estes resultados também são comparáveis àqueles já reportados na literatura (TABELA 10).

Os resultados apresentados pelo presente trabalho demonstram uma grande eficiência em produção de éster, uma vez que a conversão foi alta (acima de 98%) em um tempo de reação bastante reduzido (3 h), resultando em uma produtividade de 76 mg/h.g_{catalisador}. A maioria dos trabalhos reportou razões molares de 1:1 e 1:3 (ácido:álcool), confirmando os resultados encontrados tanto pelo delineamento fatorial como para o ensaio do estudo do efeito da razão molar, onde altas concentrações de etanol foram prejudiciais às reações de síntese catalisadas pela lipase. A temperatura empregada neste trabalho foi baixa (30°C) e, quando comparado a maioria dos trabalhos, a quantidade de unidades totais necessárias foi relativamente reduzida para as conversões apresentadas, mostrando um excelente desempenho da lipase de *R. microsporus* produzida por FES na síntese de ésteres etílicos. Observando a tabela 10, quando se avalia a produtividade em éster (mg/h.g_{catalisador}), os resultados obtidos pelo presente trabalho (76 mg/h.g_{catalisador}) foram da mesma ordem que aqueles reportados por Salum *et al.* (2008) e melhores que aqueles reportados por Fernandes *et al.* (2007) e Pires-Cabral, da Fonseca e Ferreira-Dias (2010) (9 e 5 mg/h.g_{catalisador}, respectivamente). Isto é especialmente interessante quando se observa o número de unidades enzimáticas da lipase de *C. rugosa*, quando se utilizou 210 U para uma produtividade cerca de 5 vezes menor (5 mg/h.g_{catalisador}) que aquela obtida pelo presente trabalho (23 mg/h.g_{catalisador}), quando se utilizou apenas 54 U, mesmo antes da otimização da reação. Isso significa que a atividade de esterificação da lipase de *R. microsporus* produzida por FES foi maior que aquela observada por Pires-Cabral, da Fonseca e Ferreira-Dias (2010) para a lipase de *C. rugosa* imobilizada em Hypol FHP.

TABELA 10 - ESTUDOS DE SÍNTESE DE ÉSTERES POR ESTERIFICAÇÃO CATALISADA POR LIPASES.

Microrganismo produtor da lipase	Tipo de Enzima/ Suporte	Éster	T (°C)	U	RM (ácido:álcool)	Cossolvente	Conversão (%)	t (h)	Produtividade (mg/h.g _{catalisador}) *	Referência
<i>Rhizopus oryzae</i>	Celite 545	Acetato de butila	37	500	1:1	heptano	80	24	** nc	BEN SALAH <i>et al.</i> (2007)
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB 11	Farelo de milho (sólido fermentado)	Oleato de etila	37	60	1:3	<i>n</i> -heptano	94	18	9	FERNANDES <i>et al.</i> (2007)
<i>Lipozyme CALB</i> (Novozyme)	Enzima livre	Oleato de etila	55	** nc	1:6,13	Ausência	95	72	** nc	MARCHETTI e ERRAZU (2008)
<i>Candida rugosa</i>	Poliuretano hidrofílico (Hypol FHP)	Butirato de etila	30	210	1:1	<i>n</i> -hexano	80	36	5	PIRES-CABRAL <i>et al.</i> (2010)
<i>Rhizopus chinensis</i>	Células inteiras liofilizadas	Oleato de metila	30	238	1:1	Ausência	> 96	8	500	QIN <i>et al.</i> (2008)
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB 11	Accurel EP 100	Oleato de etila	37	615	1:3	<i>n</i> -heptano	100	3	67	SALUM <i>et al.</i> (2008)
<i>Candida antarctica</i> Novozyme (435)	Resina acrílica	Laurato de cinamila	30	** nc	1:1	tolueno	60	2	6000	YADAV e DHOOT (2009)
<i>Rhizopus microporus</i>	Bagaço de cana e farinha de girassol (sólido fermentado)	Oleato de etila	37	54	1:5	<i>n</i> -heptano	79	7	23	Este trabalho (Ensaios preliminares)
<i>Rhizopus microporus</i>	Bagaço de cana e farinha de girassol (sólido fermentado)	Oleato de etila	30	120	1:3	<i>n</i> -heptano	> 98	3	76	Este trabalho (Após a otimização)

* Produtividade = massa de éster (mg) produzido em 1 h de reação, por 1 g de catalisador.

** Dados não citados pelo autor.

1.1.1 Validação dos resultados de síntese por CG

Ao final do estudo de otimização da reação de esterificação, foi realizado um ensaio de validação do método Lowry-Tinsley, pela injeção de amostras de uma mesma reação em cromatógrafo de fase gasosa (4.7.1.2) e análise pelo método colorimétrico (4.6.2).

A validação foi realizada em duplicata, as condições do ensaio foram aquelas já otimizadas anteriormente (RM 1:3 - ácido:etanol; temperatura de 30°C e 120 U). As reações foram acompanhadas durante 4 h, alíquotas de 200 µL foram coletadas em intervalos de 1 h (FIGURA 11).

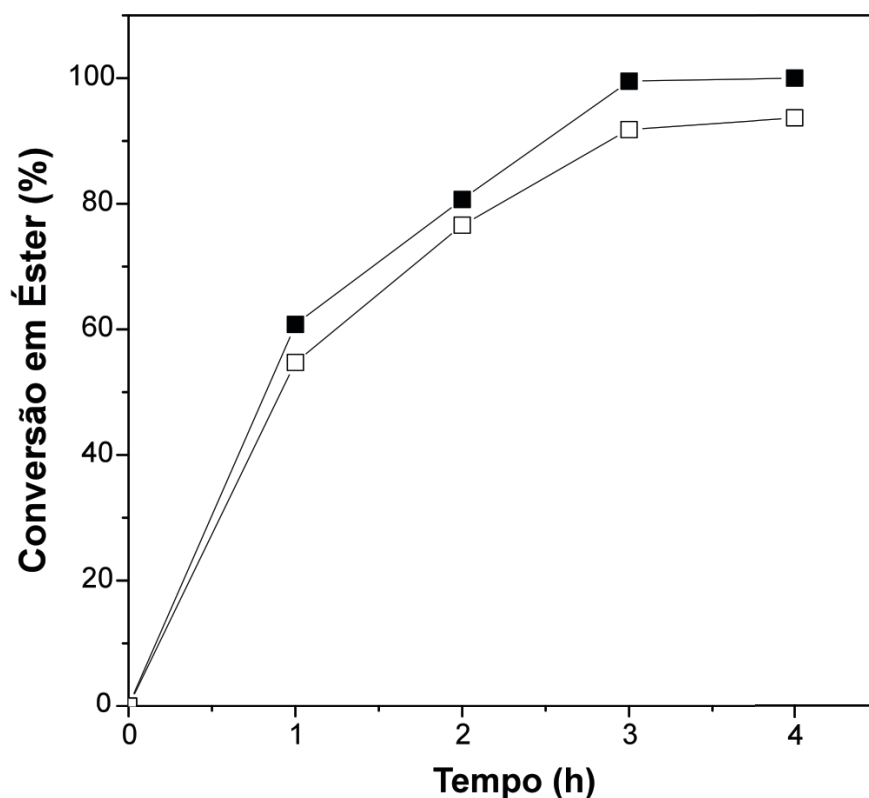


FIGURA 11 – COMPARAÇÃO ENTRE OS DOIS MÉTODOS DE ANÁLISE DE ÉSTERES PARA UMA MESMA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM *N*-HEPTANO, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM (UNIDADES ENZIMÁTICAS TOTAIS = 120 U). RAZÃO MOLAR (ÁCIDO:ÁLCOOL) = 1:3. MÉTODO ANALÍTICO: (■) LOWRY-TINSLEY; (□) CROMATOGRAFIA DE FASE GASOSA. Condições de reação: 30°C, 180 rpm.

Neste caso, os resultados mostraram a validade do método Lowry-Tinsley, uma vez que as respostas apresentadas pelos dois métodos, em porcentagem de conversão

em éster, foi bastante próxima. A conversão em éster obtida por CG foi menor ($93,4\% \pm 0,4$ em 3 h) do que aquela obtida pelo método de Lowry-Tinsley ($98,9\% \pm 0,7$ em 3 h). Isto pode ser devido às perdas durante o processo de isolamento e purificação da amostra antes da injeção no CG ou mesmo a diferenças inerentes à metodologia.

Uma vez otimizadas as condições de reação e, visando uma maior produção em massa de éster, torna-se interessante o estudo das reações de esterificação aumentando-se a concentração dos substratos no meio.

1.1.2 Efeito da presença do cossolvente no rendimento da reação

No presente trabalho investigou-se a possibilidade de utilizar um sistema livre de cossolvente, para isso foi estudada a redução da concentração do cossolvente no meio reacional e sua influência no rendimento da síntese de ésteres por esterificação.

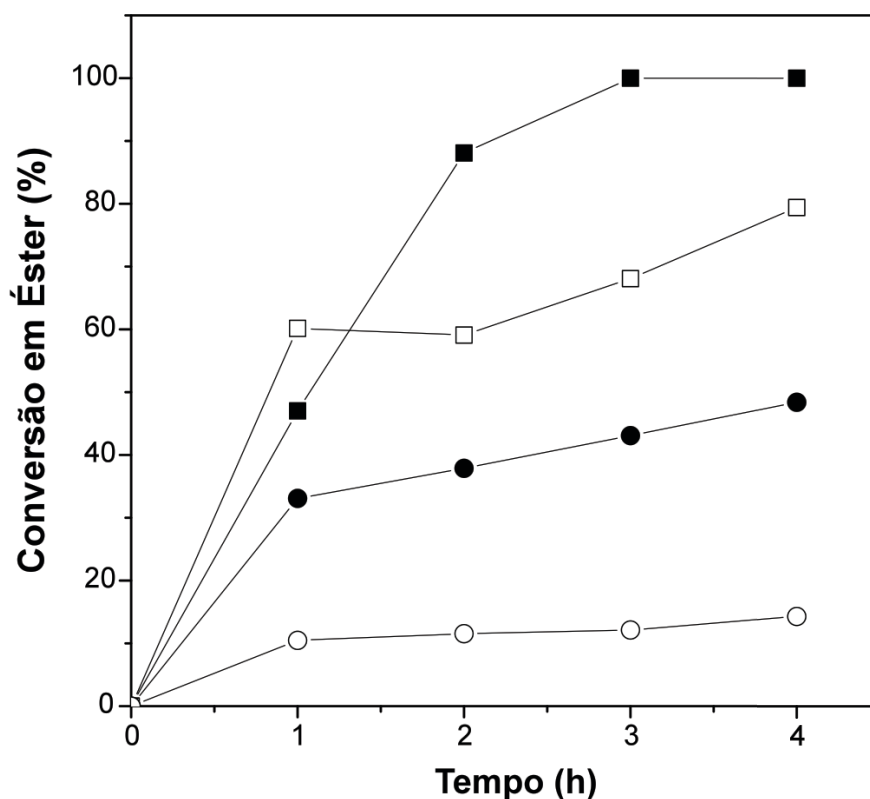


FIGURA 12 - EFEITO DA PRESENÇA DE COSSOLVENTE NA SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS POR ESTERIFICAÇÃO, UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM PRODUZIDA POR FES. (UNIDADES ENZIMÁTICAS TOTAIS = 120 U). CONCENTRAÇÃO DE *n*-HEPTANO (% V/V) = (■) 96% (70 mmol.L⁻¹ DE ÁCIDO; 210 mmol.L⁻¹ DE ETANOL); (□) 80% (0,35 mol.L⁻¹ DE ÁCIDO; 1,05 mol.L⁻¹ DE ETANOL); (●) 65% (0,70 mol.L⁻¹ DE ÁCIDO; 2,10 mol.L⁻¹ DE ETANOL); (○) REAÇÃO LIVRE DE COSSOLVENTE (30 mmol DE ÁCIDO; 90 mmol DE ETANOL). Condições de reação: razão molar 1:3 (ácido:álcool), 30°C, 180 rpm.

Observa-se, na Figura 12, que quando se eliminou o cossolvente da reação, a conversão em éster foi baixa (12% em 3 h) quando comparada àquelas onde o *n*-heptano atuou como cossolvente (43, 68 e 98% em 3 h, para as reações com 65, 80 e 96%, v/v, de *n*-heptano, respectivamente). No entanto, quando se trata de produtividade em éster, esta relação pode mudar, a exemplo deste ensaio, onde os meios mais concentrados produziram maiores quantidades de éster que o meio mais diluído (96%, v/v de cossolvente), no mesmo intervalo de tempo, utilizando a mesma quantidade de sólido fermentado.

Para o meio livre de cossolvente, a produtividade foi de 192 mg/h.g_{catalisador}, equivalentes a produção de 1,2 g de éster em 3 h de reação, com conversão de apenas 12%. No caso do meio contendo 96% (v/v) de cossolvente a quantidade de ácido no início desta reação foi de 0,30 g, como a conversão foi de cerca de 100% em 3 h, a quantidade de éster produzida neste caso foi de apenas 0,30 g (equivalente a uma produtividade de 64 mg/h.g_{catalisador}). Já para os outros ensaios a produção de éster foi equivalente em 3 h de reação, as reações com 80% (v/v) de cossolvente e em meio livre de cossolvente produziram 1,2 g de éster (equivalentes a 192 mg/h.g_{catalisador}). O ensaio que produziu maior quantidade de éster foi aquele que utilizou 65% (v/v) de cossolvente, 1,4 g de éster em 3 h ou 224 mg/h.g_{catalisador}. Estes resultados mostram que para a síntese de ésteres etílicos por esterificação, foi possível eliminar o cossolvente da reação com equivalente produção em massa de éster para os diferentes sistemas estudados.

1.2 OTIMIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO

1.2.1 Transesterificação em fracos agitados

1.2.1.1 Estudos preliminares

Tendo em vista a otimização da reação de etanólise do óleo de milho, alguns ensaios preliminares foram realizados para investigar os níveis e as variáveis a serem estudadas no delineamento fatorial aplicado à produção de ésteres etílicos por transesterificação via catálise enzimática. Foram estudados os efeitos da razão molar óleo:álcool e de dois cossolventes e ensaios de estabilidade da lipase de *R. microsporus* contida no sólido fermentado.

1.2.1.1.1 Estabilidade da lipase frente ao etanol em presença dos substratos

Para estudar a estabilidade da atividade lipolítica contida no sólido fermentado frente a diferentes concentrações de etanol, o sólido fermentado foi incubado em presença dos substratos (óleo de milho e etanol) a 37°C, e do cossolvente *n*-heptano, com agitação de 180 rpm durante 72 h, simulando as condições de reações de transesterificação. Ao final do experimento, o sólido foi lavado com *n*-hexano e a atividade hidrolítica residual quantificada pelo método titulométrico.

Foi importante testar a estabilidade da lipase em presença de diferentes razões molares óleo:etanol durante a etanolise do óleo de milho (FIGURA 13), a fim de estabelecer as melhores condições de concentração dos substratos a serem estudadas no delineamento fatorial. Observou-se que, para uma razão molar de 1:1 (óleo:etanol), a enzima foi estável por até 25 h de reação (100% da atividade inicial) e que perde apenas cerca de 30% de sua atividade ao final de 75 h de incubação na presença dos substratos. Verificou-se também o efeito de diminuição da atividade lipolítica pelo aumento da concentração do etanol no meio reacional. Este efeito é observado na Figura 13, onde o sólido fermentado perde cerca de 55% de sua atividade inicial após 72 h de contato com o etanol, presente em uma razão molar de 1:15 (óleo:álcool).

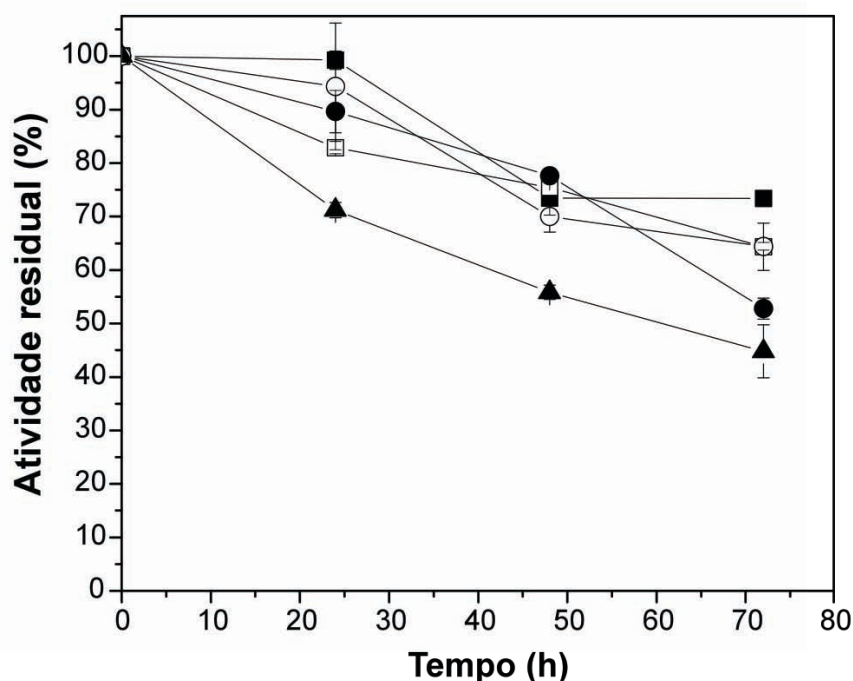


FIGURA 13 - ATIVIDADE RESIDUAL DE HIDRÓLISE DA LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM PRODUZIDA POR FES (ATIVIDADE INICIAL = 91,00 U.g⁻¹ DE SÓLIDO SECO, 1,00 g DE SÓLIDO FERMENTADO) FRENTA A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ETANOL NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MILHO A 37°C. RAZÃO MOLAR ÓLEO:ETANOL = (■) 1:1; (□) 1:3; (●) 1:5; (○) 1:10; (▲) 1:15.

Observando-se as cinéticas da perda de atividade (Figura 13) durante a reação de transesterificação, pode-se concluir que uma maior concentração de etanol presente no meio tende a diminuir a atividade residual da enzima, e, que esse efeito é intensificado pelo tempo de incubação. Este efeito já tinha sido verificado para as reações de esterificação e confirma, portanto, os resultados anteriores. Estes resultados são de grande importância para esse tipo de reação, uma vez que a máxima produção em éster deve ocorrer antes do início da perda de atividade da enzima.

Conforme já explicado anteriormente, a perda de atividade enzimática pode ser atribuída à inibição competitiva da enzima pelo etanol, à desnaturação da enzima por remoção da água de solvatação desta, ou a efeitos difusionais, uma vez que o etanol é parcialmente insolúvel no óleo (YU *et al.*, 2007; NOUREDDINI, GAO e PHILKANA, 2005).

Hernández-Martín e Otero (2008) também encontraram redução da atividade da lipase comercial de *C. antartica* imobilizada em resina macroporosa quando em contato com quantidades mais elevadas de etanol, pois quando elevaram a quantidade de álcool no meio de 1:4,5 para 1:25 (RM óleo:álcool), a lipase perdeu 9% de sua atividade inicial em apenas 7 h de reação.

Salum *et al.* (2010) estudaram a estabilidade do sólido fermentado contendo a lipase de *B. cepacia* em diferentes concentrações de etanol e, encontrou que com apenas 10% (v/v) de etanol no meio a lipase perdeu cerca de 40% de sua atividade inicial em 24 h.

Portanto, os resultados obtidos para o estudo da estabilidade da lipase de *R. microsporus* frente ao etanol durante a etanólise do óleo de milho, sugerem que, para manutenção da atividade enzimática, baixas concentrações de etanol são indicadas.

1.2.1.1.2 Efeito do cossolvente

As reações de transesterificação são desfavorecidas em meio aquoso, uma vez que o equilíbrio é deslocado para a formação dos ácidos graxos livres, porém, essas reações podem ocorrer facilmente em um solvente orgânico. Quando apenas óleo e etanol são utilizados como substratos, a adição de um solvente orgânico adequado (cossolvente) pode ser necessária para a obtenção de bons rendimentos na reação de transesterificação (ISO *et al.*, 2001).

Os resultados dos experimentos comparativos utilizando *n*-heptano e *n*-hexano como cossolventes na etanólise do óleo de milho, estão mostrados na Figura 14. Verificou-se que, até 48 h de reação, quando ocorre a conversão máxima em éster, não

há diferenças significativas na conversão (54 - 57%) entre os dois cossolventes; a partir deste tempo há um decréscimo da conversão quando se utilizou *n*-hexano (43%, 72 h). Assim, o *n*-heptano foi o solvente escolhido para os ensaios subseqüentes, pois, além de ter propiciado um melhor resultado, apresenta uma pressão de vapor menor em relação ao *n*-hexano, reduzindo os riscos ao se trabalhar com temperaturas mais elevadas em um sistema fechado. Além disso, a partir dos dados destes experimentos, optou-se por realizar os ensaios do delineamento fatorial em 48 h, que foi o tempo de máxima conversão observado.

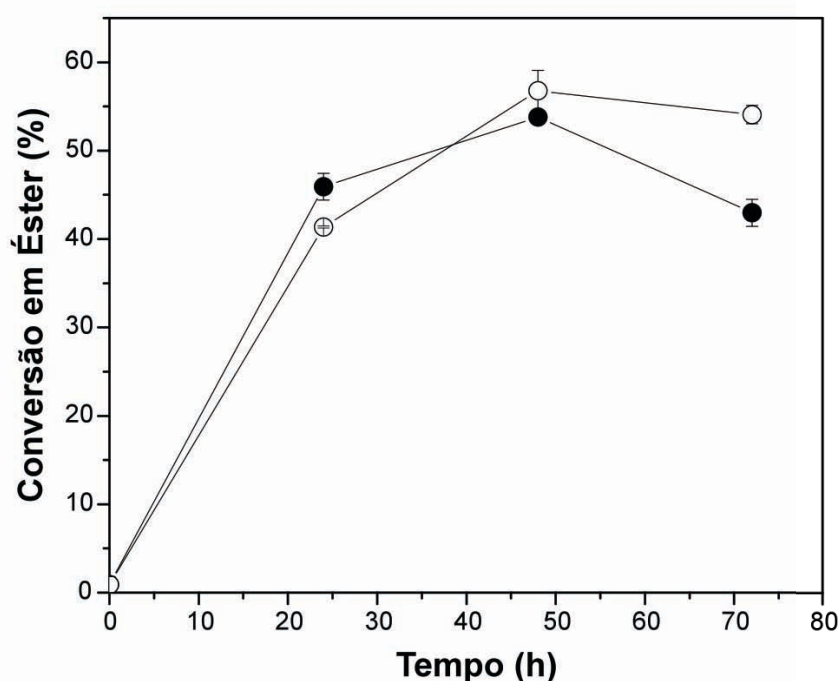


FIGURA 14 - EFEITO DO COSSOLVENTE NA ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM (91 U.g⁻¹ DE SÓLIDO SECO, 1,00 g DE SÓLIDO FERMENTADO). RAZÃO MOLAR 1:5 (ÓLEO:ETANOL), SOLVENTE = (●) *n*-HEXANO; (○) *n*-HEPTANO. Condições de reação: 37°C, 180 rpm.

A seleção do solvente é um fator importante na catálise enzimática, devido à interferência direta do solvente na atividade, estabilidade e especificidade da enzima. Os solventes menos nocivos às enzimas são os mais hidrofóbicos, por não interagirem significativamente com a água essencial à camada protéica, levando à perda da atividade enzimática. As enzimas, quando em suspensão em solventes hidrofóbicos, requerem uma menor quantidade de água para a manutenção de sua atividade em comparação às

enzimas suspensas em solventes hidrofílicos (LAANE, TRAMPER e LILLY, 1986).

Particularmente para reações de transesterificação catalisadas por lipases, estudos feitos por Chen *et al.* (2009) e Qin *et al.* (2008) mostraram que os solventes mais adequados são aqueles cuja polaridade é muito baixa, como o *n*-hexano e o *n*-heptano. Qin *et al.* (2008) testaram nove solventes, com diferentes valores de $\log P$, para a reação de transesterificação do óleo de soja catalisada pela lipase de *R. chinensis*. O maior rendimento de éster (86,7%) foi observado em *n*-heptano ($\log P = 4,0$). Solventes orgânicos com $\log P$ entre 4,0 e 4,5 apresentam melhor desempenho do que outros. Solventes orgânicos com um valor de $\log P$ abaixo de 2 não são considerados adequados para reações envolvendo biocatalisadores (STRAATHOF e ADLERCEUTZ, 2000). Isto porque solventes com valores de $\log P$ abaixo de 2 (hidrofílicos) podem causar a inativação da enzima, por alterar sua conformação ativa, uma vez que têm maior afinidade pela água da camada de hidratação da enzima que aqueles cujos valores de $\log P$ estão acima de 2 (hidrofóbicos).

Lima *et al.* (2004) verificaram a estabilidade da lipase de *B. cepacia* em vários solventes (com diferentes valores de $\log P$) e encontraram que dentre os solventes menos polares (tolueno, *n*-hexano, *n*-heptano e *iso*-octano), a enzima apresentou maior ativação em *n*-heptano (atividade residual de $121\% \pm 6$).

A presença do cossolvente pode aumentar o contato entre as moléculas de substrato e a lipase, além de melhorar os processos difusionais entre substrato e produto. Outro fator importante, é a redução da concentração de alcoóis de cadeia curta pelos solventes hidrofóbicos, diminuindo assim o efeito tóxico desses alcoóis sobre as lipases. Todos os dados reportados validam os resultados encontrados por este trabalho (FIGURA 14), justificando a utilização do *n*-heptano como cossolvente das reações.

1.2.1.1.3 Efeito da razão molar

Em teoria, para a conversão do óleo em seu éster etílico correspondente, pelo menos três equivalentes molares de etanol são necessários; porém, um pequeno excesso de álcool no meio pode favorecer a reação no sentido da síntese dos ésteres (SINGH e SINGH, 2010; HERNÁNDEZ-MARTÍN *et al.*, 2008; SINHA, AGARWAL e GARG, 2008; AKOH *et al.*, 2007; MARCHETTI, MIGUEL e ERRAZU, 2007; MA e HANNA, 1999; SCHUCHARD *et al.*, 1998). A Figura 15 mostra o efeito da razão molar óleo:etanol na reação de transesterificação catalisada pela lipase de *R. microsporus*.

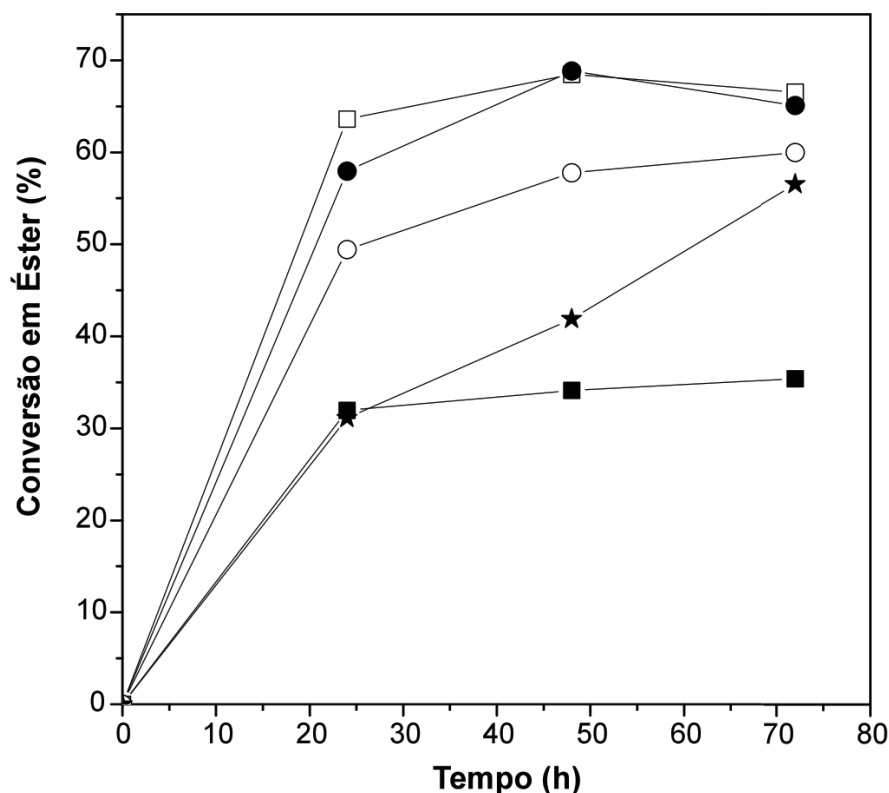


FIGURA 15 – EFEITO DA RAZÃO MOLAR DOS SUBSTRATOS NA ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO EM *n*-HEPTANO, CATALISADAS PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM (91 U.g⁻¹ DE SÓLIDO SECO, 1,00 g DE SÓLIDO FERMENTADO). RAZÃO MOLAR (ÓLEO:ÁLCOOL) = (■) 1:1; (□) 1:3; (●) 1:5; (○) 1:10; (★) 1:15. Condições de reação: 37°C, 180 rpm.

O excesso de álcool em relação à razão estequiométrica de 1:3, foi estudado para: (1) assegurar conversões elevadas de transesterificação dos TAGs, uma vez que essa reação consiste de três etapas reversíveis e (2) minimizar as limitações de difusão. No entanto, níveis muito altos de álcool podem inibir a enzima e, assim, diminuir sua atividade catalítica para a reação de transesterificação (NOUREDDINI, GAO e PHILKANA, 2005).

Para este trabalho, os melhores resultados foram obtidos com as razões molares 1:3 e 1:5 (cerca de 69% em 48 h). Quando a concentração de etanol no meio de reação foi baixa (1:1, óleo:etanol), a conversão em éster foi de cerca de 30% após 24 h de reação e manteve-se constante até 72 h, já que apenas um equivalente molar do reagente limitante (etanol) estava disponível. A fim de testar o rendimento da reação em concentrações mais elevadas do álcool, adicionou-se um excesso de etanol no meio, empregando-se as razões molares de 1:10 e 1:15 (óleo:etanol), obtendo-se 58% e 42%

de conversão em 48 h, respectivamente.

Qin *et al.* (2008) investigaram o efeito da razão molar na metanólise do óleo de soja catalisada pela lipase de *R. chinensis*, e obtiveram uma conversão de 30% em 24 h para uma razão molar de 1:1 (óleo:álcool), enquanto para as razões molares 1:2 e 1:3 a conversão foi inferior a 10% no mesmo intervalo de tempo. Segundo os autores, o excesso de metanol causou desnaturação irreversível à enzima.

Salis *et al.* (2005) estudaram razões molares óleo:álcool de 1:3, 1:6, 1:9 e 1:12, e obtiveram melhores resultados em razões com equivalentes molares de etanol mais baixos (1:3 e 1:6), quando utilizaram a lipase de *B. cepacia* imobilizada em terra diatomácea para a butanólise da trioleína.

No entanto, existem trabalhos onde razões molares óleo:etanol inferiores a 1:3 levam a maiores conversões. Fernandes *et al.* (2007) estudaram razões molares de 1:3, 1:4,5 e 1:6 (óleo:etanol) para a etanólise do óleo de milho, e obtiveram melhores resultados com a razão molar 1:6 (óleo:etanol) (95% de conversão em 120 h), quando utilizaram o sólido fermentado contendo a lipase de *B. cepacia*. Wang, Wu e Zong (2008), por meio de um delineamento fatorial 5^3 , estudaram as conversões da reação de metanólise do óleo de milho, catalisada pela lipase comercial de *Thermomyces lanuginosus*, em diferentes razões molares óleo:metanol (de 1:2,32 a 1:5,68) e encontraram que as melhores condições (84% de conversão em 12 h) envolviam uma razão molar de 1:5 (óleo:metanol).

A partir dos resultados para o estudo do efeito da razão molar, pode-se concluir que uma maior concentração de etanol presente no meio foi prejudicial à produção dos ésteres, confirmando os resultados de inibição/desnaturação da enzima pelo etanol mostrados anteriormente (FIGURA 13, *item 5.3.1.1.1*). Desta forma, passou-se a utilizar nas reações seguintes, razões molares óleo:etanol mais elevadas, ou seja, concentrações mais baixas de etanol.

1.2.1.2 Otimização das condições de etanólise do óleo de milho por delineamento fatorial

A partir dos resultados obtidos nos estudos preliminares, foi realizado um delineamento fatorial 2^3 com triplicata no central, para otimizar a etanólise do óleo de milho. Nesse estudo, utilizou-se como modelo os níveis e as variáveis já estudados para a reação de esterificação, com a diferença de que no caso da transesterificação o substrato é o óleo de milho, portanto, estudou-se o efeito da variável razão molar óleo:etanol neste caso. A concentração inicial do óleo de milho foi de 70 mmol.L⁻¹ e, de

acordo com o delineamento, as concentrações de etanol variaram em 210, 350 e 490 mmol.L⁻¹. As reações foram feitas em *n*-heptano, em um agitador orbital a 180 rpm e foram seguidas por 48 h. Foi realizado um controle, com o substrato não fermentado, tendo como objetivo garantir que a catálise da reação de etanólise do óleo de milho ocorresse somente por ação da lipase contida no sólido fermentado.

A Tabela 11 mostra os resultados de conversão em éster para os ensaios realizados no delineamento fatorial, bem como as condições aplicadas a cada experimento. Nos ensaios do delineamento fatorial, os efeitos principais (EP) foram calculados a partir da Tabela 11, utilizando a Equação 1 (item 4.4.2).

TABELA 11 - RESULTADOS EXPERIMENTAIS DO DELINEAMENTO FATORIAL 2³ APLICADO NO ESTUDO DA REAÇÃO DE ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO, UTILIZANDO A LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM CONTIDA NO SÓLIDO FERMENTADO LIOFILIZADO.

Variáveis	Níveis		
	Inferior (-1)	Médio (0)	Superior (+1)
X₁ - Temperatura (°C)	30	37	44
X₂ - Razão molar (óleo:etanol)	1:3	1:5	1:7
X₃ - Unidades Enzimáticas Totais (U)	60	90	120

Experimento	X ₁	X ₂	X ₃	* Éster (%)
1	-1	-1	-1	60
2	-1	-1	+1	65
3	-1	+1	+1	82
4	+1	+1	+1	76
5	+1	+1	-1	75
6	+1	-1	-1	75
7	-1	+1	-1	62
8	+1	-1	+1	91
9	0	0	0	56
10	0	0	0	58
11	0	0	0	58

O desvio padrão calculado a partir do ponto central foi de $\pm 1,15$.

A concentração inicial de óleo de milho em cada experimento foi de 70 mmol.L⁻¹.

Atividade hidrolítica da lipase = 91 U/gSS.

* Conversão em éster após 48 h de reação.

Os experimentos 9, 10 e 11 (TABELA 11) são referentes à triplicata do ponto central, e o desvio calculado foi de $\pm 1,15$. Este desvio foi então aplicado para todo o conjunto de experimentos. As melhores condições de reação alcançaram rendimentos acima de 80% e 90% - experimentos 3 e 8 - respectivamente. Os coeficientes de contraste dos efeitos principais e secundários observados para a etanólise do óleo de milho foram calculados da mesma forma que aqueles do delineamento fatorial das reações de esterificação (item 4.4.2). Os efeitos principais (EP), calculados a partir destes

resultados são apresentados na Tabela 12 e, para melhor visualização dos resultados, no gráfico apresentado na Figura 16.

TABELA 12 - VALORES DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS PRINCIPAIS E SECUNDÁRIAS DO DELINEAMENTO FATORIAL, CALCULADOS A PARTIR DOS RESULTADOS DA TABELA 11.

Variáveis	Efeitos (p.p.) ^a
T (°C)	+ 12 ± 1,15
^b RM	+ 1 ± 1,15
^c Unidades Enzimáticas Totais (U)	+ 10 ± 1,15
T x U	- 2 ± 1,15
T x RM	- 8 ± 1,15
U x RM	- 0,2 ± 1,15
T x U x RM	- 7 ± 1,15

^a p.p. = Pontos percentuais.

^b RM = razão molar óleo de milho:etanol.

^c Unidades Enzimáticas Totais (U) = quantidade de enzima utilizada nos experimentos.
DP (desvio padrão) = ± 1,15.

Os efeitos individuais mais importantes foram o da temperatura e o da quantidade de enzima adicionada ao meio reacional (U), com 12 e 10 pontos percentuais (p.p.) positivos, respectivamente. Isto significa que a elevação da temperatura, de 30°C para 44°C contribui para o aumento da conversão em éster de 12 p.p. e que o aumento da quantidade de unidades totais da enzima, de 60 para 120 U, leva a um aumento no rendimento da reação de 10 pontos percentuais.

O efeito da razão molar não foi significativo (+ 1 ± 1,15), uma vez que esse valor, em pontos percentuais, foi muito próximo ao desvio padrão obtido para o método. No entanto, o efeito da razão molar é melhor observado quando em conjunto com as demais variáveis estudadas, demonstrando a complexidade deste sistema. Estes resultados são opostos aos encontrados para a otimização da reação de esterificação por delineamento fatorial, quando se obteve um efeito negativo do aumento da quantidade de etanol na razão molar (ácido:etanol) de 1:3 a 1:7 (significativo em - 32 p.p.). A estabilidade da atividade enzimática mostrada na Figura 13 (item 5.3.1.1.1) em presença dos substratos da transesterificação pode explicar estes resultados, pois após 48 h de incubação, a lipase manteve cerca de 80% de sua atividade hidrolítica residual. É provável que a presença do óleo de milho (o único componente da reação diferente da reação de esterificação) tenha protegido a enzima da inibição pelo etanol.

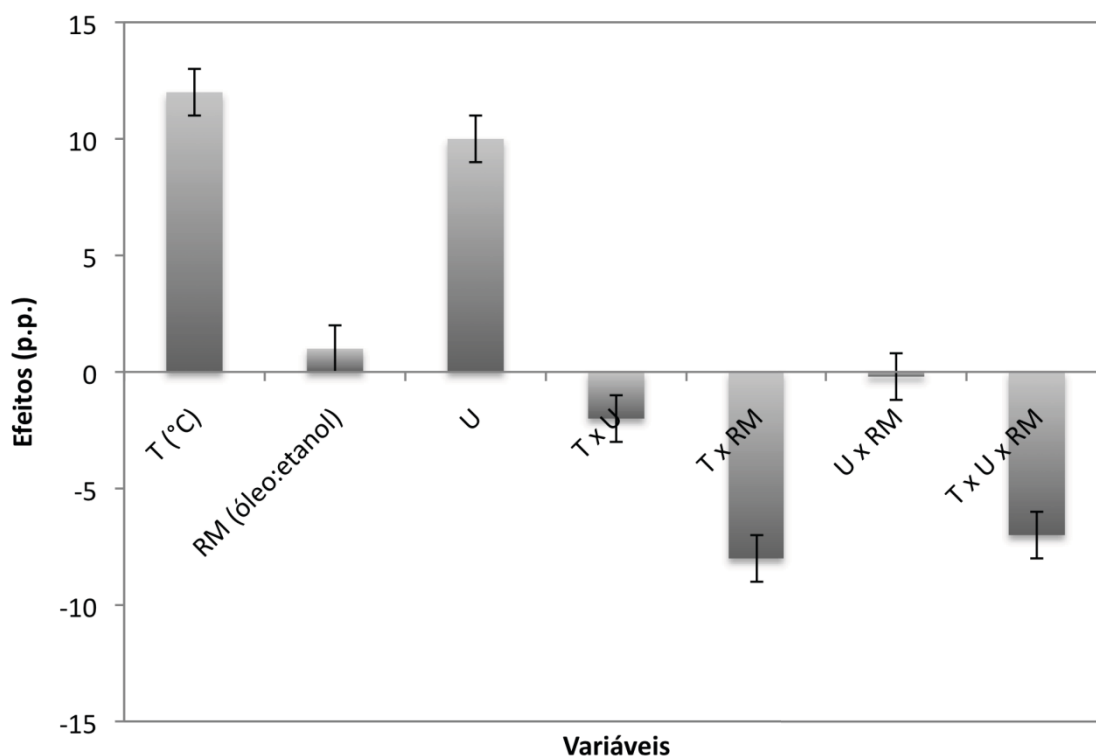


FIGURA 16 – EFEITOS DAS VARIÁVEIS PRINCIPAIS E SECUNDÁRIAS SOBRE AS RESPOSTAS DO DELINEAMENTO FATORIAL APLICADO À SÍNTESE DE ÉSTERES POR TRANSESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM. VARIÁVEL-RESPOSTA: PORCENTAGEM DE CONVERSÃO EM ÉSTER. Condições: 48 h de reação, 180 rpm.

Dentre os efeitos de interação, o mais significativo foi o da interação entre a temperatura e a razão molar (óleo:etanol), com EP de $-8 \pm 1,15$. O segundo efeito combinado mais importante foi o da interação entre a temperatura e a razão molar (óleo:etanol), com um EP de $-2 \pm 1,15$. A complexidade do sistema é demonstrada pelo fato de a interação terciária ($T \times U \times RM$) ter sido bastante significativa ($EP = -7 \pm 1,15$).

A partir destes resultados, verificou-se que a análise da influência das variáveis na reação de transesterificação é mais complexa que aquela feita para a reação de esterificação, onde os efeitos das variáveis isoladas foram mais significativos (item 5.3.3), pois aqui há uma grande influência dos efeitos secundários (FIGURA 16). Portanto, os resultados sugerem que as variáveis estudadas na transesterificação não podem ser avaliadas isoladamente, uma vez que seus efeitos são dependentes entre si.

A interpretação destes resultados pode ser melhor visualizada pela interpretação geométrica da variação das respostas com as variáveis mostrada na Figura 17.

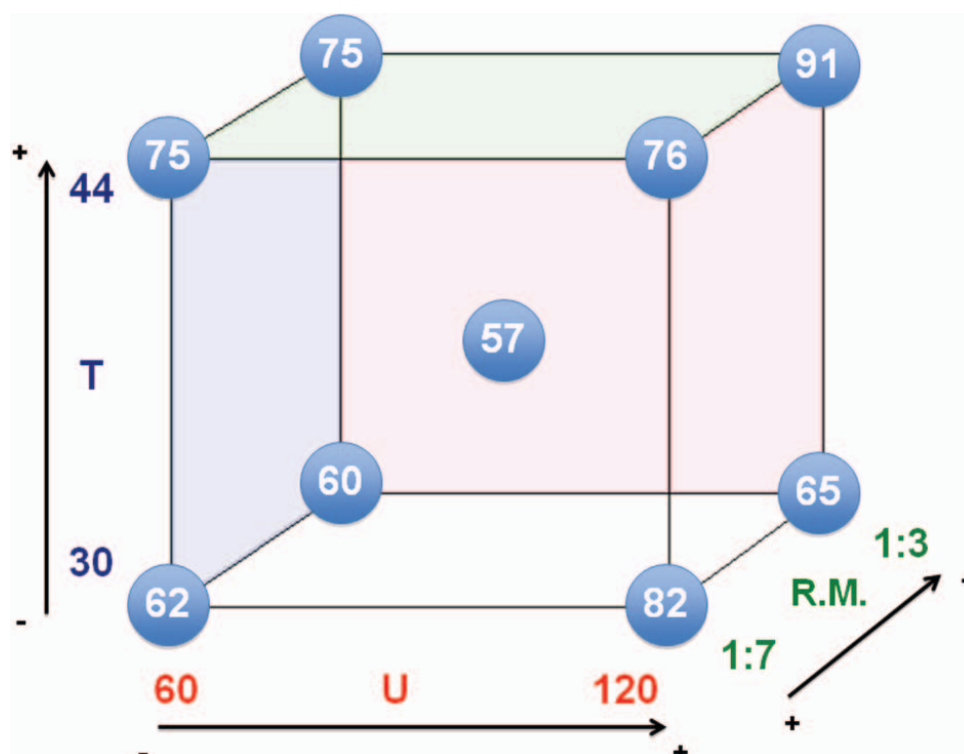


FIGURA 17 - INTERPRETAÇÃO GEOMÉTRICA DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS INVESTIGADAS NO DELINEAMENTO FATORIAL 2³ PARA O RENDIMENTO DA REAÇÃO DE ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM. VARIÁVEIS: **T** - TEMPERATURA – X₁ (30°C, NÍVEL - E 44°C, NÍVEL +), **R.M.** - RAZÃO MOLAR ÓLEO:ETANOL – X₂ (1:3, NÍVEL – E 1:7, NÍVEL +) E **U** - QUANTIDADE DE ENZIMA – X₃ (UNIDADES ENZIMÁTICAS TOTAIS, 60 U NÍVEL - E 120 U NÍVEL +). Condições: 48 h de reação, 180 rpm.

Avaliando-se a tendência das respostas, verifica-se que em dos vértices superiores a direita do cubo da Figura 17, a conversão em éster foi de 91% em 48 h. Essa foi a condição ótima de etanólise do óleo de milho catalisada pela lipase de *R. microsporus* produzida por FES encontrada pelo delineamento fatorial. Esse resultado foi atingido com o máximo de enzima no meio reacional (120 U), razão molar 1:3 (óleo:etanol) e temperatura de 44°C. Esses resultados foram melhores que aqueles obtidos nos ensaios preliminares (item 5.4.1.1.3), onde a conversão máxima em éster foi de 68% em 48 h, com razão de 1:5 (óleo:etanol), a 37°C.

Estudos recentes, empregando lipases de origem distinta, alcançaram conversões altas em um intervalo de tempo bastante reduzido (TABELA 13).

TABELA 13 – ESTUDOS DE SÍNTESE DE ÉSTERES POR TRANSESTERIFICAÇÃO CATALISADA POR LIPASE. (continua)

Microrganismo produtor da lipase	Tipo de Enzima/Suporte	TAGs/Álcool	T (°C)	U	RM (TAG:álcool)	Cossolvente	Conversão (%)	Tempo (h)	Produtividade (mg/h.g _{catalisador}) *	Referência
<i>Candida sp.</i>	Lipase imobilizada em malha têxtil	Óleo de cozinha usado/ Metanol	45	** nc	1:3	hexano	91	nc	** nc	CHEN <i>et al.</i> (2009).
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB 11	Farelo de milho (sólido fermentado)	Óleo de milho/ Etanol	37	68	1:6	<i>n</i> -heptano	95	120	4	FERNANDES <i>et al.</i> (2007)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Células imobilizadas em cubos de espuma de poliuretano	Óleo de soja/ Metanol	30	nc	1:3	Ausência	91	50	50	HAMA <i>et al.</i> (2007)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Resina acrílica	Óleo de soja / Etanol	25	148	1:3	Ausência	84	7	140	HERNÁNDEZ-MARTÍN e OTERO (2008)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Gel hidrofóbico	Óleo de soja / Metanol	35	** nc	1:7,5	Ausência	67	1	320	NOUREDDINI <i>et al.</i> (2005)
<i>Rhizopus chinensis</i>	Células inteiras liofilizadas	Óleo de soja / Metanol	30	238	1:3	Ausência	87	72	150	QIN <i>et al.</i> (2008)
<i>Candida antarctica</i> (N435)	Suporte hidrofóbico	Gordura animal/ Etanol	45	** nc	1:4	<i>t</i> -butanol	65	24	1000	RIVERA <i>et al.</i> (2009)
<i>Candida antarctica</i> (N435)	Suporte hidrofóbico	Gordura animal/ Etanol	45	** nc	1:4	Ausência	80	48	200	RIVERA <i>et al.</i> (2009)

TABELA 13 – ESTUDOS DE SÍNTESE DE ÉSTERES POR TRANSESTERIFICAÇÃO CATALISADA POR LIPASE. (conclusão)

Microrganismo produtor da lipase	Tipo de Enzima/Suporte	TAGs/ Álcool	T (°C)	U	RM (TAG:álcool)	Cossolvente	Conversão (%)	Tempo (h)	Produtividade (mg/h.g _{catalisador}) *	Referência
<i>Candida antarctica</i>	Resina acrílica	Óleo de Semente de algodão/ Metanol	50	6000	1:6	<i>t</i> -butanol	97	24	2433	ROYON <i>et al.</i> (2007)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Accurel® MP1004	Óleo de soja / Metanol	30	1500	1:8	Ausência	96	49	320	SALIS <i>et al.</i> (2008)
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB 11	Bagaço de cana e farinha de girassol (sólido fermentado)	Óleo de Soja/ Etanol	50	72	1:3	Ausência	95	46	145	SALUM <i>et al.</i> , 2010
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Enzima livre	Óleo de milho/ Metanol	35	260	1:5	<i>t</i> -butanol	84	12	609	WANG <i>et al.</i> (2008)
<i>Rhizopus microporus</i>	Bagaço de cana e farinha de girassol (sólido fermentado)	Óleo de milho/ Etanol	37	90	1:5	<i>n</i> -heptano	68	48	8	Este trabalho (Ensaio preliminares)
<i>Rhizopus microporus</i>	Bagaço de cana e farinha de girassol (sólido fermentado)	Óleo de milho/ Etanol	44	120	1:3	<i>n</i> -heptano	91	48	15	Este trabalho (Após otimização)

* Produtividade = massa de éster (mg) produzido em 1 h de reação, por 1 g de catalisador.

** Dados não citados pelo autor.

Foi possível otimizar as condições da reação de etanólise do óleo de milho catalisada pela lipase de *R. microsporus* produzida por FES, uma vez que, a produtividade em éster obtida nas condições otimizadas pelo delineamento fatorial foi quase o dobro (15 mg/h.g_{catalisador}) daquela obtida em ensaios preliminares (8 mg/h.g_{catalisador}), com a mesma quantidade de óleo adicionada no início da reação (TABELA 13).

Chen *et al.* (2009), utilizando a lipase de *Candida sp.* imobilizada em malha têxtil, verificaram que com o aumento da concentração de *n*-hexano (de 0 a 15%, m/m) na metanólise de óleo de cozinha usado, a concentração de éster também aumentou (de 65 para 88%). Nelson, Foglia e Marmer (1996) realizaram experimentos em batelada utilizando a lipase imobilizada de *Mucor miehei*, e encontraram conversões de 95% em éster com alcoóis de cadeia curta, como metanol e etanol, na presença de hexano como cossolvente. Contudo, na ausência do solvente, o metanol foi o menos eficiente, com um rendimento em ésteres metílicos de 19,4%. O baixo rendimento foi atribuído ao efeito inibitório causado pelo metanol sobre a enzima. Já para Qin *et al.* (2008) a presença do cossolvente não teve efeito significativo sobre a metanólise do óleo de soja catalisada pela lipase livre liofilizada de *Rhizopus chinensis*, quando se fez a adição sucessiva de três equivalentes molares de metanol ao meio reacional livre de cossolvente. O rendimento da reação utilizando *n*-heptano como cossolvente (0,65 mol.L⁻¹ de óleo de soja) foi de 87% em 72 h (150 mg/h.g_{catalisador}), para a reação otimizada livre de cossolvente, o rendimento foi o mesmo.

Apesar de o cossolvente ter mostrado grande influência no que diz respeito aos valores de conversão em éster, a quantidade total de éster produzida ao final das reações com concentrações mais altas de substratos pode ser maior. Desta forma, se faz importante o estudo das reações com redução na concentração do cossolvente, bem como daquelas em meio livre de cossolvente.

1.2.1.3 Efeito da adição do etanol em etapas

Após a otimização das condições da reação de transesterificação em presença do cossolvente *n*-heptano, ensaios foram realizados para melhorar ainda mais a produtividade obtida. Sabe-se que as enzimas são geralmente instáveis em alcoóis de cadeia curta, como metanol e etanol. Uma alternativa para prevenir a desnaturação ou inibição da enzima pelo álcool etílico e aumentar o rendimento da reação é a adição deste substrato em etapas, o que foi estudado no presente trabalho. Este procedimento foi primeiramente proposto por Shimada *et al.* (1999), e tem sido adotado por muitos autores (CHEN *et al.*, 2009; QIN *et al.*,

2008; WANG, WU e ZONG, 2008; HAMA *et al.*, 2007; ROYON *et al.*, 2007; BAN *et al.*, 2001).

Como um dos objetivos deste trabalho era investigar a possibilidade de reduzir a concentração do cossolvente no meio reacional, a fim de produzir quantidades maiores (em massa) de éster, foram realizados ensaios com concentrações mais elevadas dos substratos (0,35 e 0,70 mol.L⁻¹ de óleo de milho; 1,05 e 2,10 mol.L⁻¹ de etanol), em comparação com aquelas utilizadas anteriormente (70 mmol.L⁻¹ de óleo de milho; 210 mmol.L⁻¹ de etanol). Desta forma, tendo em vista os resultados reportados na literatura para reações de transesterificação com adição do etanol em etapas, este efeito foi estudado simultaneamente com o efeito do aumento da concentração dos substratos.

A Figura 18 mostra a porcentagem de conversão em éster para as reações onde o etanol foi adicionado em três etapas e para aquelas onde o etanol foi adicionado em etapa única, já no início da reação.

Nota-se na Figura 18 (**B**) que, quando o etanol foi adicionado em mais de uma etapa, a porcentagem de conversão em éster foi aumentada, principalmente para a reação utilizando uma concentração maior dos substratos (0,70 mol.L⁻¹ de óleo, 2,10 mol.L⁻¹ de etanol). Neste caso, a conversão em 48 h foi de 57% (70 mg/h.g_{catalisador}), quando o etanol foi adicionado em etapas sucessivas, e de apenas 2% (3 mg/h.g_{catalisador}) com o etanol adicionado diretamente no início da reação. Esses resultados comprovam que concentrações muito elevadas de etanol no meio tendem a desnaturar a enzima, e que a adição parcial do álcool ao sistema reduz esse efeito.

Quando se utilizou uma concentração menor de substratos (0,35 mol.L⁻¹ de óleo, 1,05 mol.L⁻¹ de etanol), percebeu-se que a quantidade de etanol presente no meio não foi tão prejudicial quanto para o meio mais concentrado (Figura 18 - **A**). Mesmo assim, a adição em etapas do etanol, forneceu conversões mais altas, especialmente ao longo da reação. Enquanto para a reação com adição de etanol em etapa única, a conversão foi de 49% em 48 h (32 mg/h.g_{catalisador}), para a reação com adição em etapas, no mesmo intervalo de tempo, 62% dos TAGs presentes no óleo foram convertidos em seus ésteres (38 mg/h.g_{catalisador}).

Como já era de esperar, as produtividades foram maiores para este ensaio quando comparadas àquelas obtidas na reação otimizada anteriormente (15 mg/h.g_{catalisador}) (5.4.1.2). Isso se deve ao fato de que com a redução do cossolvente, a concentração dos substratos é aumentada, ou seja, a massa de óleo disponível para conversão em éster é maior.

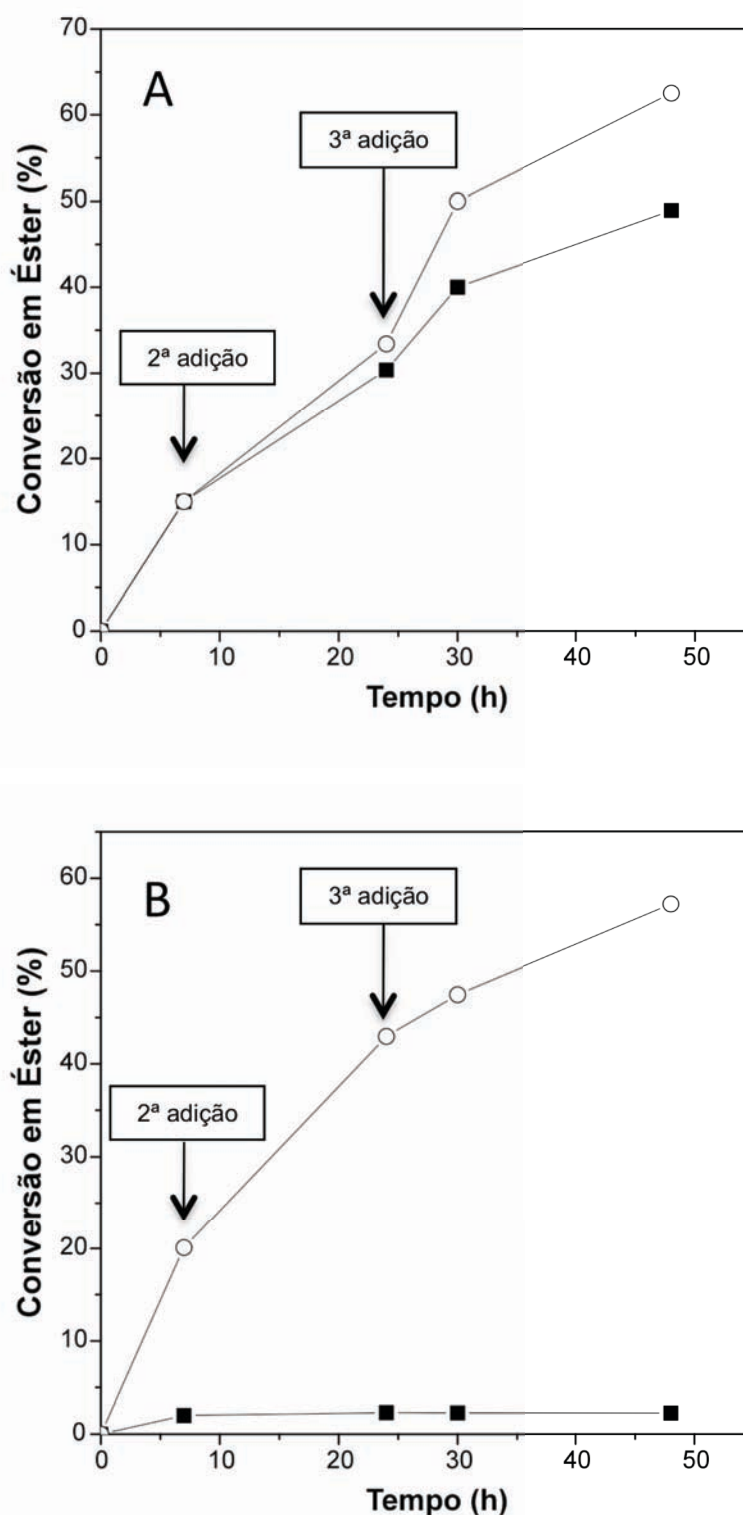


FIGURA 18 - EFEITO DA ADIÇÃO DO ETANOL EM ETAPAS NAS REAÇÕES DE ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM (UNIDADES ENZIMÁTICAS TOTAIS = 120 U). FIGURA **A** (0,35 mol.L⁻¹ DE ÓLEO, 1,05 mol.L⁻¹ DE ETANOL): (■) ADIÇÃO DIRETA DE ETANOL; (○) ADIÇÃO DE ETANOL EM 3 ETAPAS; FIGURA **B** (0,70 mol.L⁻¹ DE ÓLEO, 2,10 mol.L⁻¹ DE ETANOL): (■) ADIÇÃO DIRETA DE ETANOL; (○) ADIÇÃO DE ETANOL EM 3 ETAPAS. Condições de reação: Razão molar 1:3 (óleo:álcool), adição de etanol em 3 etapas, 44°C, 180 rpm.

Como ainda não havia sido feito um estudo da cinética desta reação, a primeira adição do etanol foi feita no início da reação, a segunda adição foi feita em 7 h de reação, e a terceira em 24 h.

Para estudar a cinética da reação que forneceu a maior conversão em éster [(62% em 48 h) com $0,35 \text{ mol.L}^{-1}$ de óleo, $1,05 \text{ mol.L}^{-1}$ de etanol], foi realizado um ensaio utilizando as mesmas concentrações de substrato, porém, em um intervalo de tempo maior (120 h) e a adição do etanol foi feita em zero, 24 e 48 h. Estes resultados estão apresentados na Figura 19.

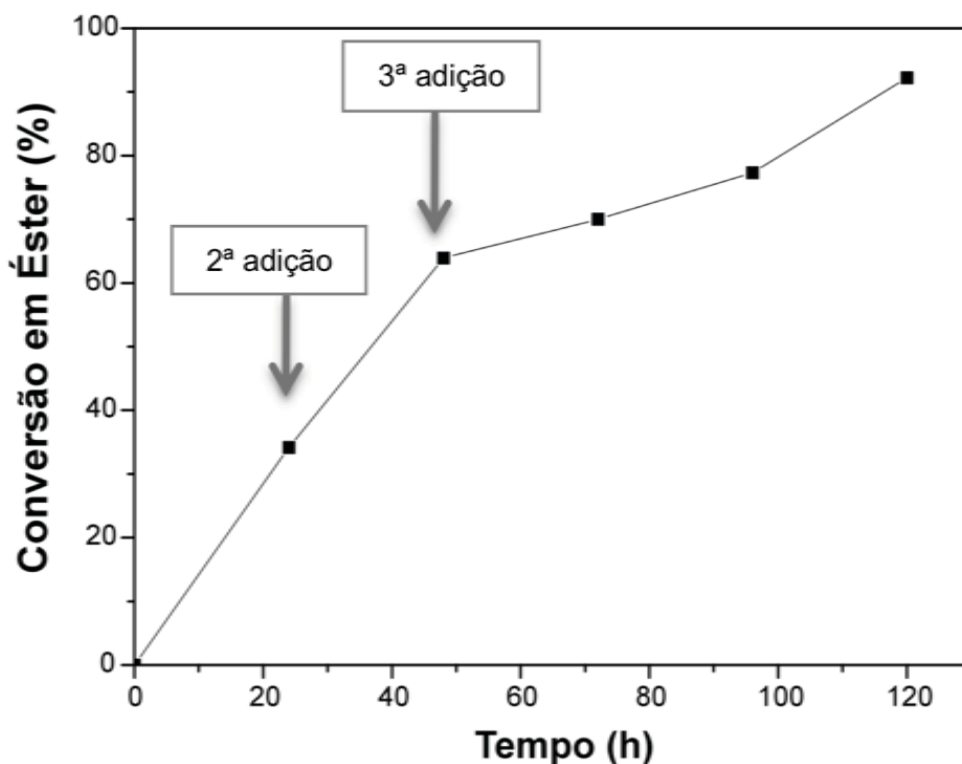


FIGURA 19 – EFEITO DA ADIÇÃO DO ETANOL EM ETAPAS NA REAÇÃO DE ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM (UNIDADES ENZIMÁTICAS TOTAIS = 120 U). CONCENTRAÇÃO DE COSSOLVENTE: 60% (v/v); CONCENTRAÇÃO DOS SUBSTRATOS: $0,35 \text{ mol.L}^{-1}$ DE ÓLEO, $1,05 \text{ mol.L}^{-1}$ DE ETANOL. Condições de reação: Razão molar 1:3 (óleo:álcool), adição de etanol em 3 etapas, 44°C , 120 h, 180 rpm.

A produtividade em éster para este ensaio (FIGURA 19) foi menor (26 mg/h.g_{catalisador} - 92% em 120 h) que aqueles reportados majoritariamente pela literatura (TABELA 13), porém, ainda assim se faz importante um estudo de otimização das condições a fim de se aumentar a produtividade do processo.

Shimada *et al.* (1999) observaram que a lipase comercial de *C. antarctica* foi inativada em uma mistura contendo mais de 1,5 equivalente molar de metanol em relação ao óleo. A reação foi então conduzida com a adição de metanol em três etapas e assim obtiveram 98,4% de conversão em 72 h (330 mg/h.g_{catalisador}). Hama *et al.* (2007) utilizaram células imobilizadas (*R. oryzae*) em cubos de espuma de poliuretano, na metanólise do óleo de soja, livre de cossolvente, com adição de metanol em 3 etapas, e obtiveram 91% de conversão em 50 h (50 mg/h.g_{catalisador}). Qin *et al.* (2008) estudaram a adição do metanol em 3 etapas consecutivas na transesterificação do óleo de soja, em *n*-heptano, catalisada pela lipase de *R. chinensis*, e obtiveram uma conversão de 87% em 72 h (150 mg/h.g_{catalisador}).

Com base nos resultados obtidos para esta etapa do trabalho e, buscando a otimização da reação de etanólise do óleo de milho, os próximos ensaios foram realizados adicionando-se o etanol ao meio em três etapas consecutivas, nos intervalos de 0, 24 e 48 h.

1.2.1.4 Efeito da presença do cossolvente no rendimento da reação

Nesta etapa, foi investigada a possibilidade de usar um sistema livre de cossolventes. Para isto, foi estudado o rendimento da reação reduzindo-se a quantidade do cossolvente no meio, até sua total eliminação. O desempenho do sistema sem cossolvente foi comparado com o sistema utilizando *n*-heptano como cossolvente. Primeiramente, foi estudada a conversão em éster no tempo de 48 h, utilizado para os ensaios do delineamento fatorial, a fim de comparar o desempenho das reações com redução da concentração do cossolvente em relação à reação que forneceu a maior conversão em éster para o delineamento fatorial. Todas as reações foram feitas utilizando as condições otimizadas pelo delineamento, alterando-se a concentração (% v/v) do cossolvente no meio e, conseqüentemente, a concentração dos substratos. Os resultados estão apresentados na Figura 20.

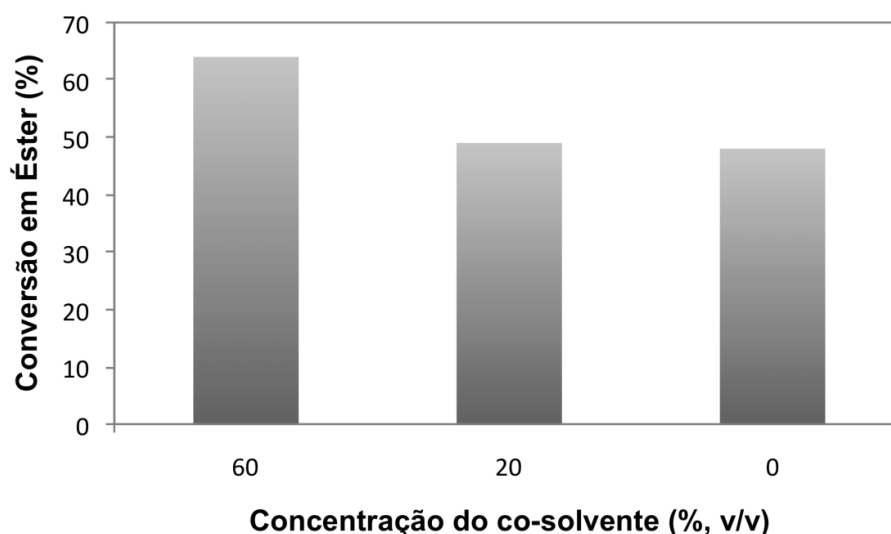


FIGURA 20 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE *n*-HEPTANO NO RENDIMENTO DA REAÇÃO DE ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM (UNIDADES ENZIMÁTICAS TOTAIS = 120 U). CONCENTRAÇÃO DOS SUBSTRATOS: 60% (v/v) COSSOLVENTE = 0,35 mol.L⁻¹ DE ÓLEO, 1,05 mol.L⁻¹ DE ETANOL; 20% (v/v) COSSOLVENTE = 0,70 mol.L⁻¹ DE ÓLEO, 2,10 mol.L⁻¹ DE ETANOL; LIVRE DE COSSOLVENTE = 15 mmol DE ÓLEO DE MILHO, 45 mmol DE ETANOL. Condições de reação: Razão molar 1:3 (óleo:álcool), adição de etanol em 3 etapas, tempo de reação: 48 h, 44°C, 180 rpm.

Devido à baixa solubilidade do etanol e a alta viscosidade do óleo, a transesterificação em sistemas livres de cossolvente pode não ser tão eficiente (SALIS *et al.*, 2008). Observa-se na Figura 20 que as porcentagens de conversão em éster foram tão menores quanto menor a concentração do cossolvente no meio. Ainda assim, foi possível obter uma conversão de 48% em 48 h de reação para o meio livre de cossolvente (106 mg/h.g_{catalisador}). Quando a concentração de cossolvente foi de apenas 20% (v/v) de cossolvente no meio, a conversão foi de 49% em 48 h (75 mg/h.g_{catalisador}). Com 60% (v/v) de cossolvente, 64% dos TAGs do óleo de milho foram convertidos em seus ésteres etílicos em 48 h (48 mg/h.g_{catalisador}). Observa-se que, apesar de as conversões serem tão menores quanto menor a concentração do cossolvente no meio, maior é a produtividade em massa de éster por unidade de tempo.

De posse desses resultados, torna-se importante o estudo da cinética das reações onde o teor de cossolvente foi reduzido, tendo como justificativa as numerosas vantagens em se trabalhar com um sistema livre de cossolvente como a possibilidade de aumentar a concentração dos substratos, evitando-se custos de recuperação do solvente ao final da reação (FORESTI e FERREIRA, 2005), além de reduzir os riscos quando se trabalha em sistemas fechados, o que torna estes processos mais econômicos e menos impactantes para o meio ambiente (SALIS *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2009). Dessa forma, buscando

conversões mais elevadas em meios com baixo teor de cossolvente, bem como, em meio livre de cossolvente, estudou-se a cinética da reação de etanólise do óleo de milho em um intervalo de 120 h (FIGURA 21). Como já otimizado anteriormente, o etanol foi adicionado ao meio em 3 etapas consecutivas.

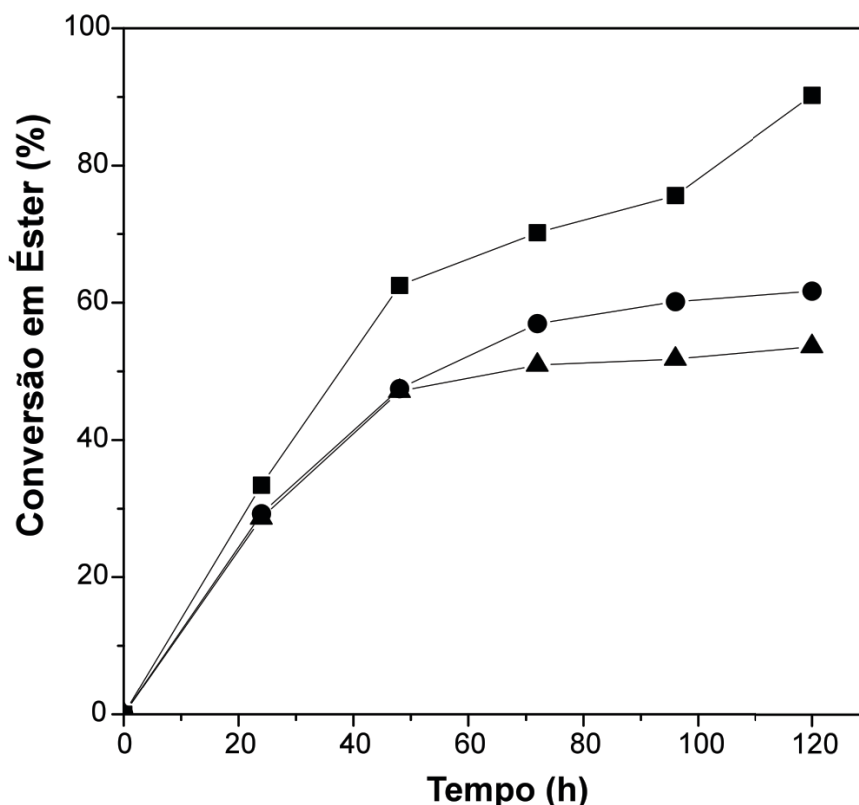


FIGURA 21 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE COSSOLVENTE NA REAÇÃO DE ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM (UNIDADES ENZIMÁTICAS TOTAIS = 120 U). CONCENTRAÇÃO DE COSSOLVENTE (V/V): (■) 60% (0,35 mol.L⁻¹ DE ÓLEO, 1,05 mol.L⁻¹ DE ETANOL); (●) 20% (0,70 mol.L⁻¹ DE ÓLEO, 2,10 mol.L⁻¹ DE ETANOL); (▲) REAÇÃO LIVRE DE COSSOLVENTE (15 mmol DE ÓLEO DE MILHO, 45 mmol DE ETANOL). Condições de reação: Razão molar 1:3 (óleo:álcool), adição de etanol em 3 etapas, 44°C, 120 h, 180 rpm.

Como esperado, as maiores conversões foram para a reação com a maior concentração de cossolvente no meio (60%, v/v), 92% em 120 h. Porém, quanto à produtividade em éster, como já era de se esperar, esta foi maior quanto maior a quantidade inicial dos substratos (óleo de milho e etanol). Obteve-se uma produtividade de apenas 6 mg/h.g_{catalisador} para a reação com 0,35 mol.L⁻¹ de óleo de milho e 1,05 mol.L⁻¹ de etanol (60% de cossolvente, v/v).

A Figura 21 mostra que a conversão para a reação com 20% (v/v) de *n*-heptano foi bastante semelhante àquelas para a reação livre de cossolvente, especialmente no início da reação, terminando com uma pequena diferença ao final da reação (120 h), 63% (32

mg/h.g_{catalisador}) para primeiro caso e 54% (38 mg/h.g_{catalisador}) para o meio livre de cossolvente.

Esses resultados indicam a possibilidade de se trabalhar com um meio livre de cossolvente, ou com um mínimo de cossolvente obtendo-se conversões razoáveis, quando comparadas àquelas reportadas na literatura. Hama *et al.* (2007) utilizaram lipases imobilizadas de *R. oryzae* e obtiveram 91% de conversão em 50 h (50 mg/h.g_{catalisador}), na ausência de cossolvente, para a metanólise do óleo de soja. Salis *et al.* (2008) estudaram a metanólise do óleo de soja, livre de cossolvente, catalisada pela lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em Accurel® MP1004 e obtiveram 96% de conversão em 49 h de reação (320 mg/h.g_{catalisador}). Rivera, Villanueva e Sandoval (2009) obtiveram conversões de 80% em 48 h (200 mg/h.g_{catalisador}), no caso do sistema livre de cossolvente, e 65% em 24 h (1000 mg/h.g_{catalisador}) para o sistema com *t*-butanol, para a reação de etanólise de gordura animal catalisada pela lipase de *C. antarctica*.

A concentração de cossolvente no meio teve uma influência significativa na porcentagem de conversão em éster para a reação de etanólise do óleo de milho catalisada pela lipase de *R. microsporus*, como descrito acima. No entanto, é importante notar que, apesar das baixas conversões obtidas, a quantidade de éster (em massa) produzida por reações com concentrações reduzidas de cossolvente foi maior (FIGURA 22).

A Figura 22 mostra a produção de éster (em gramas) para as reações com diferentes concentrações de cossolvente. Nota-se que, com a redução do cossolvente, apesar de as conversões serem menores (FIGURA 21), a massa de éster ao final da reação é maior.

Com 60% (v/v) de cossolvente, a massa de óleo no início da reação foi de 4,8 g, como a conversão foi de 92% em 120 h, a massa de éster produzida ao final da reação foi de 4,4 g. Com 20% (v/v) de cossolvente, a massa de óleo no início da reação foi de 9,7 g e como a conversão foi acima de 63% em 120 h, a massa total de éster produzida neste caso foi de 6,1 g. Na reação livre de cossolvente, a massa de óleo no início da reação foi de 14,0 g, e como a conversão foi acima de 54% em 120 h, a massa de éster produzida neste caso foi de 7,6 g em 120 h reação.

Esses resultados justificam o estudo das reações livres de cossolvente durante um intervalo de tempo maior, uma vez que de acordo com a tendência observada na Figura 21, a conversão é aumentada em função do tempo. Outro fator importante é o grau de pureza do produto final obtido nestas condições, evitando a utilização de solventes orgânicos e também as etapas de recuperação desses compostos.

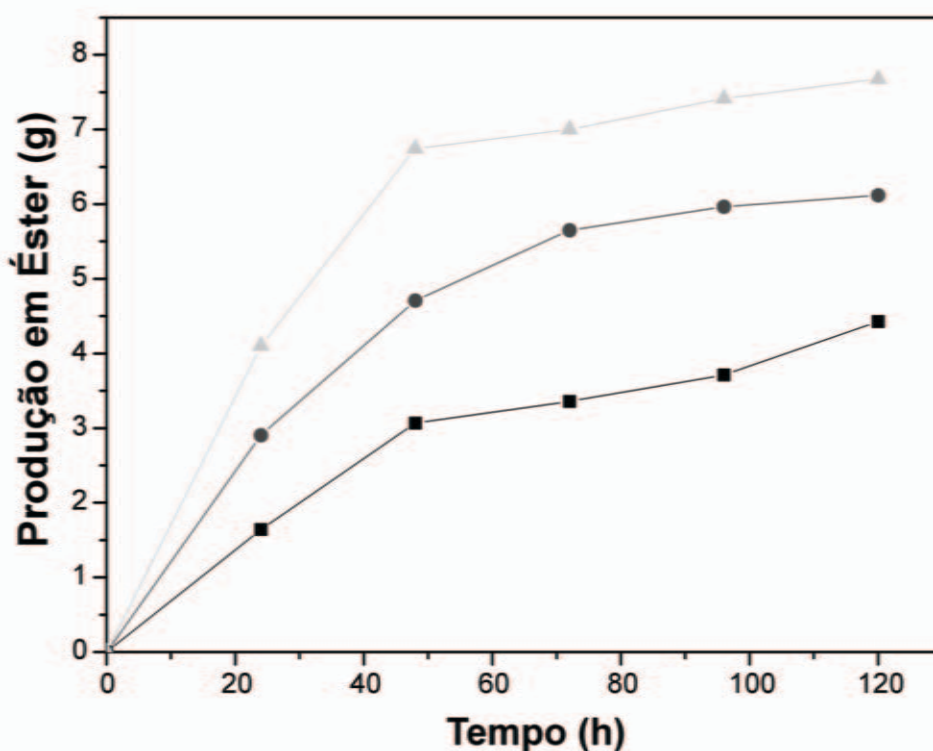


FIGURA 22 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE COSSOLVENTE NA MASSA DE ÉSTER PRODUZIDO DURANTE A REAÇÃO DE ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM (UNIDADES ENZIMÁTICAS TOTAIS = 120 U). CONCENTRAÇÃO DE COSSOLVENTE (V/V): (■) 60% (0,35 mol.L⁻¹ DE ÓLEO, 1,05 mol.L⁻¹ DE ETANOL); (●) 20% (0,70 mol.L⁻¹ DE ÓLEO, 2,10 mol.L⁻¹ DE ETANOL); (▲) REAÇÃO LIVRE DE COSSOLVENTE (15 mmol DE ÓLEO DE MILHO, 45 mmol DE ETANOL). Condições de reação: Razão molar 1:3 (óleo:álcool), adição de etanol em 3 etapas, 44°C, 120 h, 180 rpm.

1.2.1.5 Efeito da adição de água no rendimento da reação

Sabe-se que o nível de água é um parâmetro crucial em sistemas livres de cossolvente, para a manutenção da conformação da enzima. No entanto, a quantidade de água não deve ultrapassar o limite necessário para manter a atividade enzimática, pois taxas mais elevadas de água no meio tendem a deslocar o equilíbrio da reação no sentido da hidrólise (SINGH e SINGH, 2010; HERNÁNDEZ-MARTÍN *et al.*, 2008; SINHA, AGARWAL e GARG, 2008; AKOH *et al.*, 2007; MARCHETTI, MIGUEL e ERRAZU, 2007; MA e HANNA, 1999; SCHUCHARD *et al.*, 1998).

Na Figura 23 estão apresentados os resultados para a adição de 1% (m/m) de água ao sistema de transesterificação livre de cossolvente.

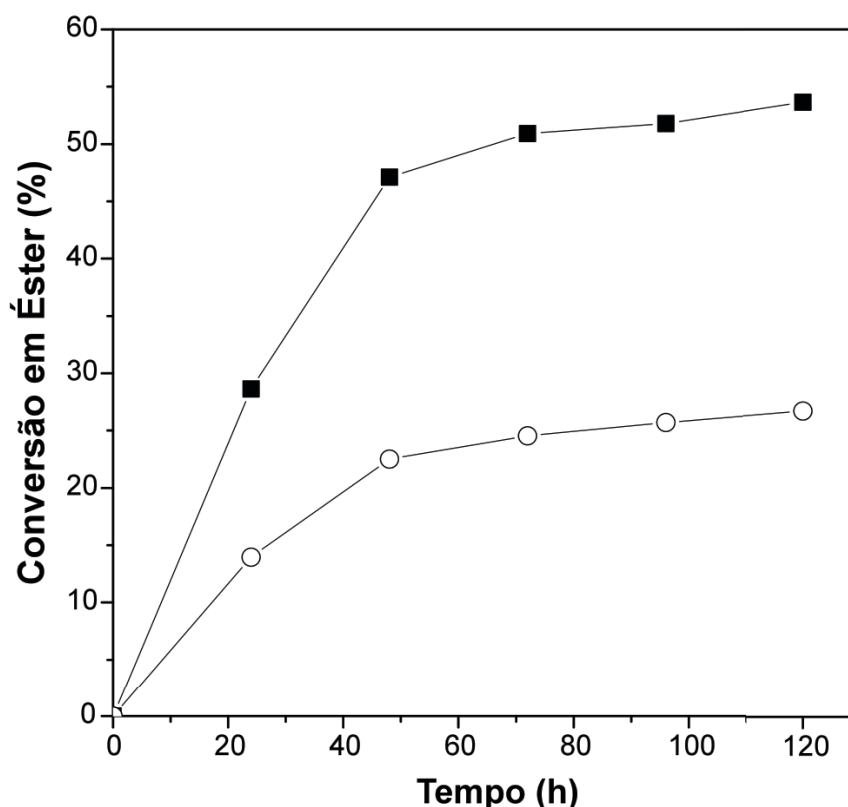


FIGURA 23 – EFEITO DA ADIÇÃO DE ÁGUA NAS REAÇÕES DE ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO NO MEIO LIVRE DO COSSOLVENTE, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM (UNIDADES ENZIMÁTICAS TOTAIS = 120 U). ADIÇÃO DE ÁGUA AO MEIO: (■) SEM ADIÇÃO DE ÁGUA; (○) ADIÇÃO DE 1% (m/m). Condições de reação: Razão molar 1:3 (óleo:álcool), adição de etanol em 3 etapas, 44°C, 180 rpm.

Os resultados apresentados na Figura 23 mostram que a conversão em éster, para o sistema de transesterificação em batelada livre de cossolvente, foi prejudicada pela adição de 1% (m/m) água ao meio reacional, pois, para o sistema sem adição de água, a conversão máxima foi de 54% em 120 h (38 mg/h.g_{catalisador}), e, no sistema com adição de água, a conversão foi reduzida à metade (27%) no mesmo intervalo de tempo (19 mg/h.g_{catalisador}). Isto pode ser explicado pela preferência da lipase em catalisar a reação de hidrólise, quando um mínimo de água está presente no meio.

Salis *et al.* (2008) estudaram um sistema com 2% (m/m) de água adicionados ao meio na metanolólise do óleo de soja, livre de cossolvente, catalisada pela lipase comercial de *P. fluorescens* imobilizada em polipropileno, e obtiveram 98% de conversão em 70 h, esses valores correspondem a uma produtividade em éster de 32 mg/h.g_{catalisador}, semelhante aquela obtida neste trabalho (38 mg/h.g_{catalisador}). Ban *et al.* (2001) também estudaram a adição de água à reação de metanolólise do óleo de soja. Neste caso, foram utilizadas células imobilizadas (*R. oryzae*) em espuma de poliuretano e, foi relatado um acréscimo de 58% na

conversão dos ésteres com 15% (m/m) de água adicionados ao meio em relação ao meio sem adição de água.

Mesmo em meio orgânico, a quantidade de água no sistema influencia na atividade catalítica da enzima de maneira significativa. O nível de hidratação da enzima é um parâmetro chave. Normalmente, a atividade enzimática aumenta com o aumento do nível de hidratação da enzima, e isso pode ser explicado pelo fato de a água atuar como um “lubrificante”, aumentando a flexibilidade interna da estrutura da enzima (NOUREDDINI, GAO e PHILKANA, 2005). Porém, assim como no sistema livre de cossolvente, existe um nível máximo de água que promove o aumento da atividade catalítica, isto é, o aumento excessivo da quantidade de água pode prejudicar a reação de transesterificação (STRAATHOF e ADLERCEUTZ, 2000), como mostrado na Figura 23.

Os dados da Figura 24 mostram o efeito da adição de água para os sistemas de transesterificação com 60 e 20% (v/v) de cossolvente no meio.

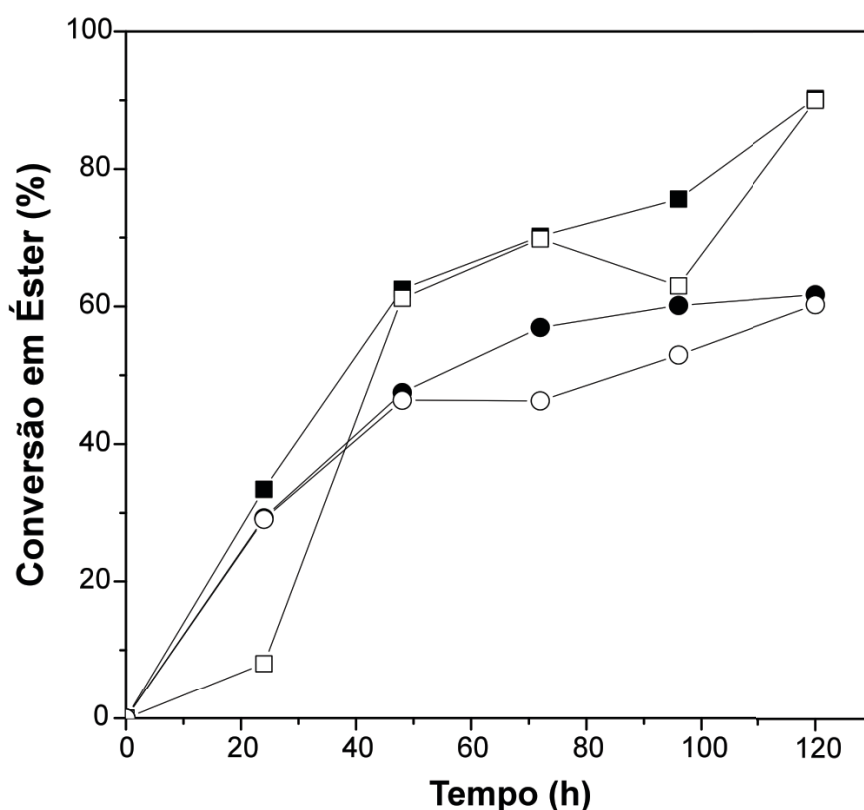


FIGURA 24 – EFEITO DA ADIÇÃO DE ÁGUA NAS REAÇÕES DE ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO COM DIFERENTES PORCENTAGENS DO COSSOLVENTE, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM (UNIDADES ENZIMÁTICAS TOTAIS = 120 U). REAÇÕES COM 60% (V/V) DE COSSOLVENTE (0,35 mol.L⁻¹ DE ÓLEO, 1,05 mol.L⁻¹ DE ETANOL): (■) SEM ADIÇÃO DE ÁGUA; (□) ADIÇÃO DE 1% (M/M) DE ÁGUA. REAÇÕES COM 20% (V/V) DE COSSOLVENTE (0,70 mol.L⁻¹ DE ÓLEO, 2,10 mol.L⁻¹ DE ETANOL): (●) SEM ADIÇÃO DE ÁGUA; (○) ADIÇÃO DE 1% (m/m) DE ÁGUA. Condições de reação: Razão molar 1:3 (óleo:álcool), etanol adicionado em 3 etapas, 44°C, 180 rpm.

Para as reações em meio de cossolvente, a adição de água ao sistema não foi tão significativa no rendimento da reação quanto para o meio livre de cossolvente. Isso pode ser devido ao fato de que, no meio de cossolvente, a quantidade de água foi menor, uma vez que a água é adicionada em relação à massa dos substratos (óleo e etanol), minimizando as condições de hidrólise. Quando se utilizou o meio com 60% (v/v) de cossolvente, a produtividade em éster foi de 26 mg/h.g_{catalisador} (90%, 120 h) foi a mesma para a reação com adição de água e sem adição de água. Quando 1% (m/m) de água foi adicionado a esse meio, as conversões foram prejudicadas nas primeiras 24 h de reação (8% com adição de água e 33% sem adição de água, equivalentes a 15 e 53 mg/h.g_{catalisador}, em produtividade de éster). Isso ocorreu até que se atingisse o equilíbrio, pois como no caso da transesterificação não há produção de água, a água adicionada é consumida já no início da reação, e os ácidos graxos formados pela hidrólise são convertidos em seus ésteres, juntamente com os TAGs do óleo. Para a reação com 20% (v/v) de cossolvente, o rendimento não foi afetado significativamente pela adição de água. A conversão foi a mesma para os dois casos (com adição de água e sem adição de água), 60% em 120 h de reação (32 mg/h.g_{catalisador}).

Ao contrário dos resultados reportados na literatura onde a adição de água aumentou as conversões das reações de transesterificação (CHEN *et al.*, 2009; QIN *et al.*, 2008; WANG, WU e ZONG, 2008; SHAH e GUPTA, 2006; NOUREDDINI, GAO e PHILKANA, 2005), neste trabalho, para a etanólise do óleo de milho catalisada pela lipase de *R. microsporus* produzida por FES, a adição de água foi prejudicial. Desta forma, optou-se por não adicionar água às próximas reações.

1.2.2 Transesterificação em biorreator de leito fixo

Reatores de leito fixo têm sido utilizados por vários autores em reações de produção de biodiesel (CHEN *et al.*, 2009; ROYON *et al.*, 2007; SHIMADA *et al.*, 2002). Estes reatores são tubulares, preenchidos com partículas do catalisador sólido. A reação ocorre na superfície do catalisador. A vantagem de se utilizar um reator de leito fixo é a maior conversão por massa de catalisador quando comparado a outros tipos de reatores catalíticos.

A fim de investigar a possibilidade de realizar a reação de etanólise do óleo de milho em biorreator de leito fixo, utilizando o sólido fermentado contendo a lipase de *R. microsporus*, foram realizadas duas reações. Uma delas em meio de cossolvente (20%, v/v)

e outra livre de cossolvente. Os resultados de conversão em éster para ambas as reações estão apresentados na Figura 25.

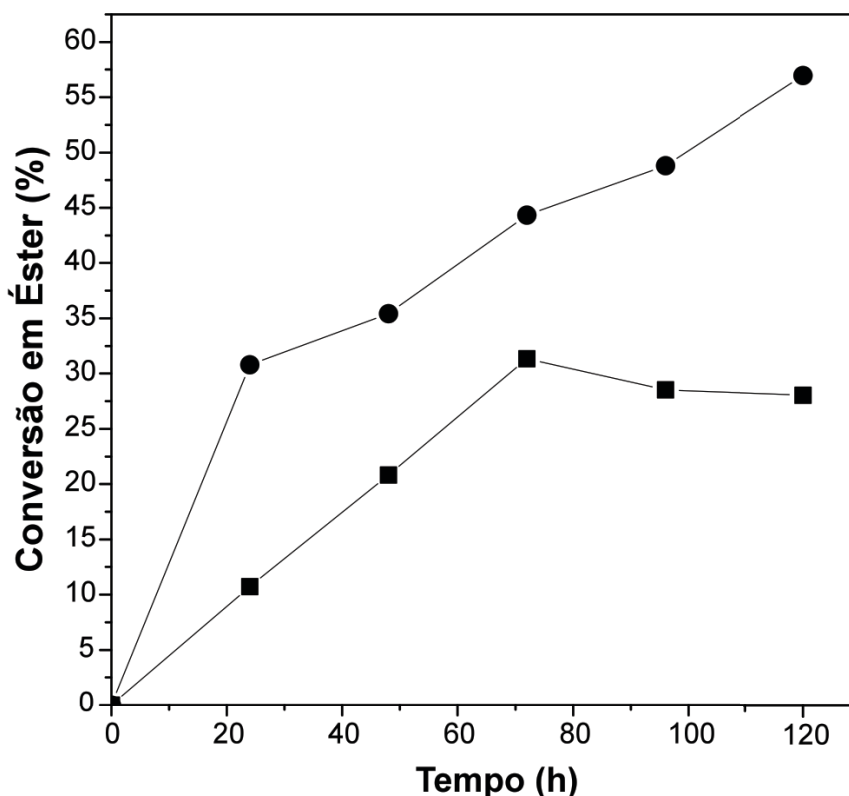


FIGURA 25 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE COSSOLVENTE NA REAÇÃO DE ETANÓLISE DO ÓLEO DE MILHO EM BIORREATOR DE LEITO FIXO, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM (UNIDADES ENZIMÁTICAS TOTAIS = 231 U, 3,00 g DE SÓLIDO FEMENTADO). MEIO: (■) LIVRE DE COSSOLVENTE (44 mmol DO ÓLEO DE MILHO E 132 mmol DE ETANOL); (●) COM 20% (V/V) DE COSSOLVENTE (0,7 mol.L⁻¹ DE ÓLEO DE MILHO, 2,1 mol.L⁻¹ DE ETANOL). Condições de reação: Razão molar 1:3 (óleo:álcool), etanol adicionado em 3 etapas, 44°C, fluxo de 2 mL.min⁻¹.

A presença do cossolvente foi um fator importante para este sistema, como já observado nas reações anteriores. A reação em meio de cossolvente apresentou conversão de 57% (50 mg/h.g_{catalisador}), enquanto a reação livre de cossolvente, apenas 28% (33 mg/h.g_{catalisador}), ambas em 120 h. A reação foi acompanhada inicialmente por CCD (FIGURA 26).

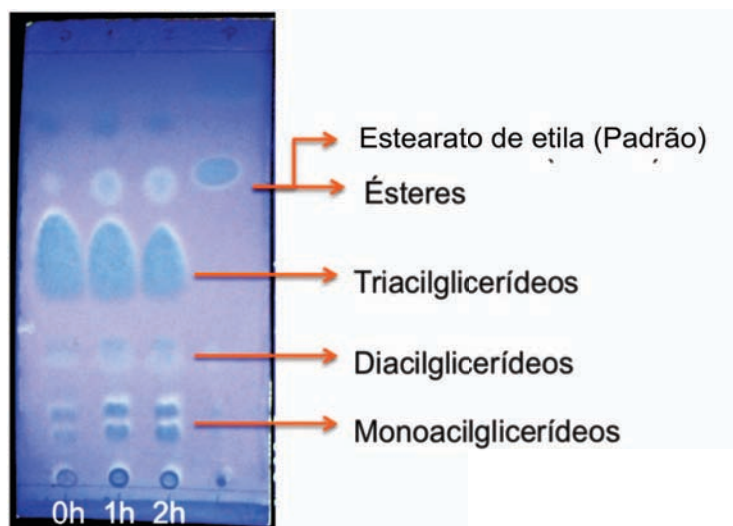


FIGURA 26 – CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA DAS ALÍQUOTAS COLETADAS NAS PRIMEIRAS HORAS DE REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO EM BIORREATOR DE LEITO FIXO UTILIZANDO *n*-HEPTANO COMO COSSOLVENTE, RAZÃO MOLAR 1:3 (ÓLEO:ÁLCOOL), FLUXO DE 2 mL.min⁻¹, 44°C.

Chen *et al.* (2009) estudaram a metanólise do óleo de fritura em biorreator de leito fixo com fluxo contínuo, catalisada pela lipase de *Candida sp.* imobilizada em malha têxtil, e obtiveram conversão de 91% em éster, utilizando *n*-hexano como cossolvente (15%, v/v). Royon *et al.* (2007) reportaram conversões de 97% em 24 h (2433 mg/h.g_{catalisador}), para a metanólise do óleo de semente de algodão em biorreator de leito fixo e fluxo descontínuo, foram utilizados o cossolvente *t*-butanol (28%, v/v) e a lipase comercial de *C. antarctica* imobilizada em resina acrílica. Hama *et al.* (2007) reportaram conversões de 91% em 50 h (50 mg/h.g_{catalisador}) de metanólise do óleo de soja catalisada pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em espuma de poliuretano, em biorreator de leito fixo e fluxo descontínuo, na ausência de cossolvente. Para o sistema estudado no presente trabalho, a produtividade em éster, em biorreator de leito fixo, foi de 50 mg/h.g_{catalisador} para o ensaio com 20% (v/v) de cossolvente e 33 mg/h.g_{catalisador} para o ensaio em meio livre de cossolvente. Royon *et al.* (2007) obtiveram uma melhor produção em éster (em meio de cossolvente), no entanto, utilizando uma lipase comercial. Já os resultados obtidos por Hama *et al.* (2007) apresentaram uma produtividade em éster comparável àquelas obtidas no presente trabalho, com a vantagem que nestes dois casos foram utilizadas lipases, do gênero *Rhizopus*, cultivadas em laboratório.

Outro dado importante é a comparação da eficiência deste sistema com o sistema de frascos agitados. A quantidade de catalisador utilizada neste sistema foi o dobro daquela utilizada em frascos agitados. A respeito da reação na presença de cossolvente, para a reação em frascos agitados, a produção foi de 6,1 g de éster em 120 h (32 mg/h.g_{catalisador}); já

para o biorreator de leito fixo, foi possível produzir 18,2 g em 120 h ($50 \text{ mg/h.g}_{\text{catalisador}}$). Já para o sistema livre de cossolvente, a produção em éster foi de 11,2 g em 120 h ($33 \text{ mg/h.g}_{\text{catalisador}}$) para o biorreator de leito fixo e 7,6 g de éster em 120 h ($38 \text{ mg/h.g}_{\text{catalisador}}$), na reação em frascos agitados. As maiores produtividades em éster, para o biorreator de leito fixo foram possíveis, pois, para este sistema foi possível utilizar um volume maior de substratos (50 mL) e mais sólido fermentado (3,0 g) do que no sistema de frascos agitados (15 mL e 1,3 g). Esses resultados mostram que o biorreator de leito fixo foi mais eficiente que o processo realizado em frascos agitados, tanto em meio de cossolvente como em meio livre de cossolvente.

1.2.3 Dosagem de glicerol no meio reacional e no sólido fermentado

Devido ao fato de o glicerol produzido nas reações de transesterificação não ter sido observado visualmente, foi realizada a análise do meio reacional depois da reação de transesterificação por CG, e o teor de glicerol encontrado na amostra foi de apenas 0,05% (m/m). Foi então realizado um ensaio para verificar se o glicerol estava aderido à superfície do sólido fermentado. Para tanto, o glicerol foi extraído de uma amostra do sólido fermentado após reação de transesterificação em frascos agitados (com conversão de 0,56 g de éster por grama de óleo) e o teor de glicerol foi medido pelo método de Soloni-Modificado (MOURA *et al.*, 1998). Foi encontrado um teor glicerol de $8,44\% \pm 0,07 \text{ g}$, correspondente a 96% do valor esperado estequiometricamente para esta reação (8,79%).

Estes resultados são interessantes do ponto de vista do processo de produção do biodiesel, uma vez que a remoção do glicerol, subproduto da reação, é uma etapa adicional requerida no processo e que acarreta aumento no custo de produção do biodiesel, tanto por processos químicos quanto por processos enzimáticos. No entanto, isso pode ser prejudicial quando se deseja utilizar o catalisador em reações seqüenciais, pois o acúmulo do glicerol pode reduzir a atividade catalítica. Segundo Dossat, Combes e Marty (2002), que utilizaram resina aniônica como suporte para a lipase de *Rhizomucor miehei*, esta adsorção do glicerol leva a uma diminuição da atividade da enzima em função do tempo. Esta perda de atividade foi atribuída às limitações de difusão através da barreira polar, formada pelo glicerol adsorvido, à transferência dos TAGs (hidrofóbicos) da fase orgânica para a enzima.

Atualmente, a reação de transesterificação tem preferência em relação à esterificação direta de ácidos graxos porque TAGs são mais comumente disponíveis do que ácidos graxos livres (DOSSAT, COMBES e MARTY, 2002). Entretanto, a reação de transesterificação tende a ser mais longa que a esterificação (devido ao número de etapas necessárias à formação dos ésteres), além da formação do glicerol, que não ocorre na esterificação.

É importante fazer-se uma comparação entre os processos de esterificação e transesterificação para a síntese de ésteres etílicos, uma vez que os resultados reportados pelo presente trabalho mostraram que as produtividades obtidas no processo de esterificação foram significativamente maiores do que as produtividades do processo de transesterificação. Uma possibilidade seria o estudo de novos processos que contenham uma etapa prévia de hidrólise dos TAGs seguido por uma etapa de esterificação vêm sendo estudados, e têm sido denominados de “hidroesterificação” (CASTRO NETO, 2008). Esse processo permite o uso de qualquer matéria-prima graxa (gordura animal, óleo vegetal, óleo de fritura usado e borras ácidas de refino de óleos vegetais, entre outros). Neste processo, todos os TAGs são convertidos em ácidos graxos, independente da acidez e da umidade que possuam, e o material assim obtido é submetido a um processo de esterificação. Com isso, é possível obter altos rendimentos em ésteres totalmente livres de glicerina, já que este componente é removido na etapa preliminar de hidrólise (LIMA *et al.*, 2008).

Assim, uma alternativa viável para a utilização do processo de esterificação seria a utilização de subprodutos industriais com altos teores de ácidos graxos, uma vez que lipases podem catalisar tanto a esterificação como a transesterificação, pode-se estudar os dois processos em série utilizando como material de partida borras de ácidos graxos que ainda contém triglicerídeos (ou vice-versa, óleos vegetais com elevada acidez), subprodutos da indústria de extração de óleos.

2. CONCLUSÕES

A partir dos estudos realizados neste trabalho, pode-se concluir que:

- Foi possível produzir a lipase de *R. microsporus* por FES utilizando como substratos o bagaço de cana-de-açúcar (resíduo agroindustrial) e a farinha de girassol. A lipase apresentou uma atividade de hidrólise de 91 U/gSS, e atividade de esterificação de 5,7 U/gSS.
- A partir do delineamento fatorial 2^3 foi possível otimizar a síntese de ésteres etílicos por reação de esterificação. Os resultados apontaram para uma maior produtividade quando utilizado um excesso de etanol (razão molar 1:3, ácido:álcool). O estudo indicou um efeito principal de maior influência na reação, o efeito da quantidade de unidades enzimáticas totais adicionadas ao meio reacional, apontando para uma melhoria na resposta de conversão em éster quando a quantidade de unidades enzimáticas no meio fosse máxima (76 mg/h.g_{catalisador}).
- Utilizando as condições otimizadas pelo delineamento fatorial para a reação de esterificação, foi possível reduzir a quantidade de cossolvente no meio de reação, obtendo-se conversões de 43% em 4 h, para o meio com redução de 32% na concentração de *n*-heptano e, 15% para o meio livre de cossolvente, no mesmo intervalo de tempo, correspondendo a uma produtividade de 224 e 192 mg de éster/h.g_{catalisador}, respectivamente.
- A reação de etanólise do óleo de milho foi otimizada por delineamento fatorial 2^3 . As melhores condições encontradas para este caso foram coerentes com aquelas do delineamento para a reação de esterificação: razão molar 1:3 (óleo:álcool) e máxima concentração de unidades enzimáticas totais no meio (120 U). Porém, no caso da reação de transesterificação, os resultados apontaram para uma maior produtividade quando a temperatura do ensaio é elevada de 30°C para 44°C, levando em conta a estabilidade da lipase à temperatura. Estas condições forneceram 91% de conversão de éster em 48 h de reação – produtividade em éster de 15 mg/h.g_{catalisador}.
- Foi possível reduzir a quantidade de cossolvente na reação de etanólise do óleo de milho em 30%, pela adição do etanol em etapas, aumentando, assim, a produção de éster (90% de conversão em 120 h, correspondente a 26 mg/h.g_{catalisador}). A reação livre de cossolvente apresentou conversão de 54% em 120 h e produtividade em éster de 38 mg/h.g_{catalisador}, demonstrando a capacidade da lipase de *R. microsporus* em catalisar este tipo de reação em meio livre de cossolvente.

- A adição de água ao meio reacional foi prejudicial à reação de etanolise do óleo de milho, especialmente na ausência do cossolvente, onde a conversão máxima da reação sem adição de água foi o dobro ($38 \text{ mg/h.g}_{\text{catalisador}}$) daquela para a reação onde 1% (m/m) de água foi adicionado ao meio ($19 \text{ mg/h.g}_{\text{catalisador}}$).
- O ensaio de transesterificação em biorreator de leito fixo apresentou maior eficiência ($50 \text{ mg/h.g}_{\text{catalisador}}$) em relação ao biorreator de frascos agitados ($32 \text{ mg/h.g}_{\text{catalisador}}$), utilizando os mesmos parâmetros [44°C ; R.M. 1:3 (óleo:etanol); 120 h], pois, para este sistema foi possível utilizar um volume maior dos substratos e maior quantidade de sólido fermentado.
- O produto obtido é praticamente livre de glicerol, constituindo um fator importante na redução do custo do processo.

3. PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, os quais demonstraram a eficiência do processo de síntese de ésteres utilizando o sólido fermentado, tanto para o sistema de frascos agitados quanto para o reator de leito fixo (em escala de laboratório), existem ainda muitos pontos a serem estudados para propiciar o aumento da produtividade em éster, dentre eles:

- o aumento da atividade lipolítica no sólido fermentado, uma vez que foi possível concluir que o aumento da quantidade de unidades enzimáticas totais no meio reacional é um parâmetro importante para atingir maiores produtividades em éster;
- a utilização de materiais de partida para a síntese do biodiesel que sejam subprodutos industriais ou comerciais, como borras contendo altos teores de ácidos graxos e óleos vegetais utilizados em frituras, por exemplo, uma vez que o processo de esterificação apresentou produtividades significativamente maiores que aquelas reportadas, no presente trabalho, para o processo de transesterificação;
- o estudo da reação em biorreator de leito fixo com fluxo contínuo;
- o aumento da escala de reação utilizando um reator de leito fixo em escala piloto para a síntese do biodiesel utilizando o sólido fermentado.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKOH, C. C.; CHANG, S.; LEE, G.; SHAW, J. Enzymatic Approach to Biodiesel Production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, 8995–9005, 2007.
- ALBERTON, D.; MITCHELL, A. M.; CÓRDOVA, J.; ZAMORA, P. P.; KRIEGER, N. Production of a fermented solid containing lipases of *Rhizopus microsporus* and its application in the pre-hydrolysis of a high-fat dairy wastewater. (*In Press*) **Food Technology and Biotechnology**, 2010.
- AL-ZUHAIR, S.; JAYARAMAN, K. V.; KRISHNAN, S.; CHAN, W. The effect of fatty acid concentration and water content on the production of biodiesel by lipase. **Biochemistry Engeneering Journal**, v. 30, p. 212-217, 2006.
- AL-ZUHAIR, S.; LIG, F. W.; JUN, L. S. Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. **Process Biochemistry**, v.42, p. 951-960, 2007.
- AOAC INTERNATIONAL. **Official Methods of analysis of AOAC International**. 18ª edição. Gaithersburg. AOAC International, 2005.
- AOCS (American Oil Chemists Society) International. Official methods of analysis. Free fatty acid: Ca 5a-40, Ce.-Ib 1989.
- ARDHAOU, M.; FALCIMAIGNE, A.; ENGASSER, J. M.; MOUSSOU, P.; PAULY, G.; GHOU, M. Acylation of natural flavonoids using lipase of *Candida antarctica* as biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 29, p. 63-67, 2004.
- BALCAO, V. M., PAIVA, A. L., MALCATA, F.X. Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 5, p. 392–416, 1996.
- BAN, K.; KAIEDA, M.; MATSUMOTO, K.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles **Biochemical Engineering Journal**, v. 8, p. 39–43, 2001.
- BANDMANN, N.; COLLET, E.; LEIJEN, J.; UHLÉN, M.; VEIDE, A.; NYGREN, P.A. Genetic engineering of the *Fusarium solani* pisi lipase cutinase for enhanced partitioning in PEG-phosphate aqueous two-phase systems. **Journal of Biotechnology**, v. 79, n. 2, p. 161-172, 2000.

- BEN SALAH, R.; GHAMGHUI, H.; MILED, N.; MEJDOUB, H.; GARGOURI, Y. Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n. 4, p. 368-372, 2007.
- BEVILAQUA, J. V.; PINTO, J. C.; LIMA L. M.; BARREIRO, E. J.; ALVES, T. L. M.; FREIRE, D. M. G. Enzymatic hydrolysis by immobilized lipase applied to a new prototype anti-asthma drug. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, p. 103-110, 2004.
- BORNSCHEUER, T. U.; BESSLER, C.; SRINIVAS, R.; KRISHNA, H.S. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. **Trends Biotechnology**, v. 20, n. 10, p. 433-437, 2002.
- BOUAID, A.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. A comparative study of the production of ethyl esters from vegetable oils as a biodiesel fuel optimization by factorial design. **Chemical Engineering Journal**, v. 134, p. 93-99, 2007.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360 de 23 de dezembro 2003. **Diário Oficial da República Federativa de Brasil**, Brasília, 26 de dez. 2003.
- BRASIL. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e B combustíveis. Lei n. 11.097 de 13 de janeiro de 2005. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 14 jan. 2005.
- BRITISH STANDARDS INSTITUTION. **BS EN 14105:2003**: Fat and oil derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME) - Determination of free and total glycerol and mono-, di-, triglyceride contents. 2003.
- BRUNS, R. E.; BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S. **Planejamento e Otimização de Experimentos**, 2ª ed., Editora Unicamp, Campinas, SP, p. 60-131, 1996.
- CASTILHO, L. R., POLATO, C. M. S., BARUQUE, E. A., SANT'ANNA J. R., G.L. & FREIRE, D. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 4, p. 239-247, 2000.
- CASTRO NETO, M. **Hidroesterificação: tecnologia de segunda geração na produção de Biodiesel**. Disponível em: <http://biocombustiveis-brasil.blogspot.com/2008/05/hidroesterificacao-tecnologia-de-segunda.html>. Acesso: 15 de fevereiro de 2010.
- CHEN, Y.; XIAO, B.; CHANG, J.; FU, Y.; LV, P.; WAG, X. Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. **Energy conversion and management**, v. 50, p. 668-673, 2009.

- CHRISTEN P., ANGELES N., CORZO G., FARRES A., REVAH S. Microbial lipase production on a polymeric Resin. **Biotechnology Techniques**, v. 9, n. 8, p. 597-600, 1995.
- COONEY G. D., EMERSON R. Thermophilic fungi. San Francisco, London: W. H. Freeman and Company. p. 3-28, 1964.
- CORDEIRO, G. C.; TOLEDO FILHO, R. D.; FAIRBAIRN, E. M. R.; TAVARES, L. M. M. Pozzolanic activity and filler effect of sugar cane bagasse ash in Portland cement and lime mortars. **Cement & Concrete Composites**, v.30, p.410-418, 2008.
- DE PAULA, M. O. TINÔCO, I. F. F.; RODRIGUES, C. S.; SILVA, E. N.; SOUZA, C.F. Potencial da cinza do bagaço da cana-de-açúcar como material de substituição parcial de cimento Portland. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.13, n.3, p.353–357, 2009
- DHARMSTHITI, S.; LUCHAI, S. Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp. THL027. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, n. 2, p. 241-246, 1999.
- DIAZ, Juan Carlo Matheos. Novos instrumentos para a biocatálise: Rastreamento, Purificação e Caracterização de lipases fúngicas termofílicas. Tese de doutorado apresentada à Universidade de la Mediterranee Aix-Marseille II. 190 páginas, 2005.
- DIAZ, J.C.M.; RODRÍGUEZ, J.A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F.; BARATTI. J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 5, p. 1042-1050, 2006.
- DOSSAT, V.; COMBES, D.; MARTY, A. Efficient lipase catalysed production of a lubricant and surfactant formulation using a continuous solvent-free process. **Journal of Biotechnology**, v. 97, p. 117-14, 2002.
- DU W., LI W., SUN T., CHEN X., LIU D. H. Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 79, p. 331-337, 2008.
- ESSAMRI, M.; DEYRIS, V.; COMEAU, L. Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents. **Journal of Biotechnology**, v. 60, n. 1-2, p. 97-103, 1998.

- FERNANDES, M. L. M.; KRIEGER, N.; BARON, A. M.; ZAMORA, P. P.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/Isooctane reversed micellar system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, p. 43-49, 2004.
- FERNANDES, M. L. M.; SAAD, E. B.; MEIRA, J. A.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 263, p. 8-13, 2007.
- FESSNER, W.; ANTHONSEN, T. **Modern Biocatalysis**. Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions, Wiley-vch. 2009.
- FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Solvent-free ethyl oleate synthesis mediated by lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on polypropylene powder. **Catalysis Today**, v. n. p. 23-30, 2005.
- FREEDMAN, B.; BUTTERFIELD, R. O.; PRYDE, E.H. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 63, p. 1375-1380, 1986.
- FUKUDA H, KONDO S, NODA H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 5, p. 405–16, 2001.
- GAYOT, X. S.; COULON, D. Modification of flavonoid using lipase in conventional media: effect of the water content. **Journal of Biotechnology**, v. 101, n. 1, p. 29-36, 2003.
- GERARD, A. S.; JULIAN, B.C. Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. **Enzyme Microbiol. Technol.**, v. 25, n. 6, p. 471-482, 1999.
- GIRALDO, L. J. L.; LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; FIGUEROA-ESPINOZA, M. C.; BAROUH, N.; BAREA, B.; VILLENEUVE, P. Lipase-catalyzed synthesis of chlorogenate fatty esters in solvent-free medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 6-7, p. 721-726, 2007.
- GIRELLI, A. M.; MATTEI, E. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. **Journal of Chromatography B**, v. 819, n. 1, p. 3-16, 2005.
- GOERING, C. E.; SCHWAB, A. W.; DAUGHERT, M. J.; PRYDE, E. H.; HEAKIN, A. J. Fuel properties of eleven vegetable oils. **American Society of Agricultural Engineers**, v. 82, p. 1472-1483, 1982.

- HALLING, P. J. Effects of water on equilibria catalysed by hydrolytic enzymes in biphasic reaction systems, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 6, p. 513–516, 1984.
- HAMA, S.; YAMAJI, H.; FUKUMIZU, T.; NUMATA, T.; TAMALAMPUDI, S.; KONDO, A.; NODA, H.; FUKUDA, H. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p. 273-278, 2007.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.
- HERNÁNDEZ-MARTÍN, E.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym® 435 Lipozyme® TL IM. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 277-286, 2008.
- HIOL, A.; JONZO, M. D.; RUGANI, N.; DRUET, D.; SARDA, L.; COMEAUA, L.C. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 421–430, 2000.
- HSU, A.; JONES, K. C.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W.N. Transesterification activity of lipase immobilized in a phyllosilicate sol-gel matrix. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 917-921, 2004.
- ILLANES A. Enzyme Biocatalysis , Principles and Applications, pág. 156, 2008.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo. Instituto Adolfo Lutz, 2005.
- ISO, M.; CHEN, B.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 16, p. 53-58, 2001.
- JACKSON, M. A.; MBARAKA, I. K.; SHANKS, B. H. Esterification of oleic acid in supercritical carbon dioxide catalyzed by functionalized mesoporous silica and an immobilized lipase. **Applied Catalysis A: General**, v. 310, p. 48–53, 2006.
- JAEGER, K. E.; RANASK, S.; KOCH, H. B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B.W. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, p. 29-63, 1994.
- JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 390-397, 2002.

- KAIEDA M., SAMUKAWA T., MATSUMOTO T., BAN K., KONDO A., SHIMADA Y. Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, n. 6, p. 627–31, 1999.
- KAIEDA, M.; SAMUKAWA, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Effect of Methanol and Water Contents on Production of Biodiesel Fuel from Plant Oil Catalyzed by Various Lipases in a Solvent-Free System. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, p. 12–15, 2001.
- KIM, H. J.; YOUN, S. H.; SHIN, C. S. Lipase-catalyzed synthesis of sorbitol–fatty acid esters at extremely high substrate concentrations. **Journal of Biotechnology**, v. 123, n. 2, p. 174–184, 2006.
- KITPREECHAVANICH, V.; MANEEBOON, T.; KAYANO, Y.; SAKAI, K. Comparative Characterization of L-Lactic Acid-Producing Thermotolerant *Rhizopus* Fungi **J. Bioscience and Bioengineering**, v. 106, N. 6, 541–546, 2008.
- KOHNO, M.; ENATSU, M.; TAKEE, R.; KUGIMIYA, W. Thermal stability of *Rhizopus niveus* lipase expressed in a *kex2* mutant yeast. **Journal of Biotechnology**, v. 81, p.141–150, 2000.
- KRIEGER, N.; BHATNAGAR, T.; BARATTI, J. C.; BARON, A. M.; LIMA, V. M.; MITCHELL, D. A. Non-Aqueous Biocatalysis in Heterogeneous Solvent Systems. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, p. 279–286, 2004.
- LAANE C., TRAMPER J., LILLY M. D. Optimization of biocatalysis in organic media. In: Laane C, Tramper J, and Lilly MD, editors. Biocatalysis in organic media. Amsterdam: Elsevier Science, p. 65– 84, 1986.
- LARISSEGGGER-SCHNELL, B.; GLUECK, S. M.; KROUTIL, W.; FABER, K. Enantio-complementary deracemization of (\pm)-2-hydroxy-4-phenylbutanoic acid and (\pm)-3-phenyllactic acid using lipasecatalyzed kinetic resolution combined with biocatalytic racemization, **Tetrahedron**, v. 62, p. 2912- 2916, 2006.
- LEE T, FOGLIA T, CHANG KS. Production of alkyl ester as biodiesel from fractionated lard and restaurant grease. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 79, p. 191–195, 2002.
- LI, L. L.; DU, W.; LIU, D. H.; WANG, L.; LI, Z. B. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. n. p. 58–62, 2006.
- LIMA, A. W. O; ANGNES, L. Biocatálise em meios aquo-restritos: fundamentos a aplicações em química analítica. **Química Nova**, v. 22, n. 2, p. 229–245, 1999.

- LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A.; BARATTI, J. C.; DE FILIPPIS, I.; FONTANA, J. D. Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 31, n. 1-3, p. 53-61, 2004.
- LIMA, R. L. L.; GONÇALVES, J. A.; MESQUITA, C. S.; DOMINGOS, A. K.; FURTADO, N. C. C.; ANTONIOSI FILHO; N. R.; ARANDA, D. A. G. Estudo Empírico da Hidrólise de Óleos Vegetais. Disponível em: (<http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007/producao/35.pdf>). Acesso: 14 de setembro de 2008.
- LOWRY, R. R.; TINSLEY, J. I. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 53, p. 470-472, 1976.
- LOZANO, P.; DIEGO, T.; CARRIÉ, D.; VAULTIER, M.; IBORRA, J. L. Synthesis of glycidyl esters catalyzed by lipases in ionic liquids and supercritical carbon dioxide. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 214, p. 113-119, 2004.
- MA F., HANNA M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v. 70:1–15, 1999.
- MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. Possible methods for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 11, p. 1300-1311, 2007.
- MARCHETTI, J. M.; ERRAZU, A. F. Comparison of different heterogeneous catalysts and different alcohols for the esterification reaction of oleic acid. **Fuel**, v. 87, p. 3477–3480, 2008.
- MAJEWSKA, P.; KAFARSKI; LEJCZAK, B. Simple and effective method for the deracemization of ethyl 1-hydroxiphosphinate using biocatalysts with lipolytic activity. **Tetrahedron: Asymetry**, v. 17, p. 2870–2875, 2006.
- MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Overview of Solid State Bioprocessing. **Biotechnology Annual Review**, v. 8, p. 183-225, 2002.
- MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; NOPHARATANA, M.; KRIEGER, N. **The bioreactor Step of SSF: A Complex Interaction of Phenomena**. In: MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. Ed. Springer, p.13-32, Heidelberg, 2006.
- MOURA, R.A.; WADA, C.S.; PURCHIO, A.; ALMEIDA, T.V. de in: Atheneu (Eds), *Técnicas de Laboratorio*, São Paulo, 3ª edição, p. 63-64, 1998.

- NAGY, V.; TOKE, E. R.; KEONG L. C.; SZATZKER G.; IBRAHIM D.; OMAR I. C.; SZAKACS, G.; POPPE L. Kinetic resolutions with novel, highly enantioselective fungal lipases produced by solid state fermentation **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 39, p. 141-148, 2006.
- NELSON, L. A.; FOGLIA, T. A. e MARMER, W. N. Lipase-catalyzed production of Biodiesel. **Journal of the American Oil Chemists Society**. v. 73, p. 1191-1195, 1996.
- NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R. S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 769-777, 2005.
- PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X.; Kinetics and mechanics of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 187-204, 2000.
- PANDEY, A., BENJAMIN, S., SOCCOL, C.R., NIGAM, P., KRIEGER, N., THOMAZ-SOCCOL, V. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 29, p. 119-131, parte 2, 1999.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 81-84, 2003.
- PENCREACH, G.; BARATTI, J. Hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in n-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: a simple test for the determination of lipase activity in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v.18, p.417-422, 1996.
- PEREIRA, R. G.; OLIVEIRA, C. D.; OLIVEIRA, J. L.; OLIVEIRA, P. C. P.; FELLOWS, C. E.; PIAMBA, O. E. Exhaust emissions and electric energy generation in a stationary engine using blends of diesel and soybean biodiesel. **Renewable Energy**, Technical Note, v. 32, n. 14, p. 2453-2460, 2007.
- PERSSON, M.; MLADENOSKA, I.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P. Preparation of lipases for use in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 6, p. 833-841, 2002.
- PIRES-CABRAL, P.; DA FONSECA, M. M. R.; FERREIRA-DIAS, S. Esterification activity and operational stability of *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams in the production of ethyl butyrate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 246-252, 2010.
- QIN, H.; YAN, X; YUN, T.; DONG, W. Biodiesel production catalyzed by whole-cell lipase from *Rhizopus chinesis*. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 29, n. 1, 41-46, 2008.

- RASSY, E.; PERRARD, A.; PIERRE, C. Application of lipase encapsulated in silica aerogels to a transesterification reaction in hydrophobic and hydrophilic solvents: Bi-Bi Ping-Pong kinetics. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, n. 3-4, p. 137-150, 2004.
- RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 174-188, 1998.
- REETZ, M. T.; JAEGER, K.E. (1998) Overexpression, immobilization and biotechnological application of *Pseudomonas* lipases. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, n. 1-2, p. 3-14.
- RIVERA, I.; VILLANUEVA, G.; SANDOVAL, G. Producción de biodiesel a partir de residuos grasos animales por vía enzimática. **Grasas y Aceites**, v. 60, n. 5, p. 470-476, 2009.
- ROYON, D.; DAZ, M.; ELLENRIEDER, G.; LOCATELLI, S. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using *t*-butanol as a solvent. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 648-653, 2007.
- RÜKOLD, S.; GROBECKER, K. H.; ISENGARD, H. D. The effects of drying on biological matrices and the consequences for reference materials. **Food Control**, v. 12, p. 401-407, 2001.
- SALIS, A. Characterisation of Accurel MP 1004 polypropylene powder and its use as a support for lipase immobilisation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 24-25, p. 75-82, 2003.
- SALIS, A.; PINNA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 119, p. 291-299, 2005.
- SALIS, A.; PINNA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Comparison among immobilised lipases o macroporus polypropylene toward biodiesel synthesis, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 54, p. 19-26, 2008.
- SALUM, T. F. C., BARON, A. M., ZAGO, E., TURRA, V., BARATTI, J., MITCHELL, D. A. and KRIEGER, N. An Efficient System for Catalyzing Ester Synthesis Using a Lipase from a Newly Isolated *Burkholderia cepacia* Strain. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 26, n. 3, p. 197-203, 2008.
- SALUM, T. F. C.; VILLENEUVE P.; BAREA B.; YAMAMOTO C. I.; CÔCCO L. C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Process Biochemistry (In Press)**, 2010.

- SANTOS, E. G., Estudo da Adsorção de Contaminantes Orgânicos Provenientes da Água de Extração do Petróleo, em Coluna de Leito Fixo, utilizando Biomassas como Adsorventes. 229 páginas. Tese de Doutorado em Engenharia de Processos entregue à Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, Campina Grande, Paraíba, 2005.
- SAXENA, R. K., SHEORAN, A., GIRI, B., DAVIDSON, W.S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, p.1-18, 2003.
- SCHIPPER, M. A. A. A reversion of genus *Rhizopus*. 1. The *Rhizopus stolonifer* group and *Rhizopus oryzae*. **Studies Mycology**, v. 25, p. 1–19, 1984.
- SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, p. 199-210, 1998.
- SHAH, S.; GUPTA, M. N., Lipase catalyzed preparation of biodiesel from *Jatropha* oil in a solvent free system. **Process Biochem**, 2006.
- SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SAMUKAWA, T.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 76, n. 7, p. 789-793, 1999.
- SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, n. 3-5, p. 133-142, 2002.
- SINGH, S. P.; SINGH, D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 200–216, 2010.
- SINHA, S.; AGARWAL, A. K.; GARG, A. Biodiesel development from rice bran oil: Transesterification process optimization and fuel characterization. **Energy Conversion and Management**, v. 49, p. 1248–1257, 2008.
- STRAATHOF, A. J. J.; ADLERCREUTZ, P. Applied biocatalysis. 2^a ed. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, p. 295-316, 2000.
- STUER, W.; JAEGER, K. E.; WINKLER, U. K. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 168, p. 1070-1074, 1986.

- SUN, S. Y.; XU, Y.; WANG, D. Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solid-state fermentation: biochemical characterization and its 164 esterification potential for ester synthesis. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 9, p. 2607–2612, 2009.
- TISS, A.; CARRIERE, F.; VERGER, R. Effects of Arabic gum on interfacial lipases binding and activity. **Analytical Biochemistry**, v. 294, n. 1, p. 36-43, 2001.
- VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M.J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical molecular biological approaches **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p. 113-148, 2000.
- VITOLO, M. **Reatores com enzimas imobilizadas**. In: LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W. and SCHMIDELL, W. *Biotechnologia Industrial*. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.
- WANG, Y.; WU, H.; ZONG, M. H. Improvement of biodiesel production by lipozyme TL IM-catalyzed methanolysis using response surface methodology and acyl migration enhancer. **Bioresource Technology**, 2008.
- YADAV, G. D.; DEVI, K. M. Immobilized lipase-catalysed esterification and transesterification reactions in non-aqueous media for the synthesis of tetrahydrofurfuryl butyrate: comparison and kinetic modeling. **Chemical Engineering Science**, v. 59, n. 2, p. 373-383, 2004.
- YADAV, G. D.; DHOOT, S. B. Immobilized lipase-catalysed synthesis of cinnamyl laurate in non-aqueous media. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 57, n. 1-4, p. 34-39, 2009.
- YANG, S. S., YUAN, S.S. Oxytetracycline production by *Streptomyces rimosus* in solid state fermentation of sweet potato residue. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 6, p. 236–244, 1990.
- YANG, S. S., SWEI, W.J. Oxytetracycline production by *Streptomyces rimosus* in solid-state fermentation of corn-cob. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 12, p. 43–46, 1996.
- YANG, X.; WANG, B.; CUI, F.; TAN, T. Production of lipase by repeated batch fermentation with immobilized *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 6, p. 2095-2103, 2005.
- YIN, C.; LIU, T.; TAN, T. Synthesis of Vitamin A Esters by Immobilized *Candida* sp. Lipase in Organic Media. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 14, n. 1, p. 81-86, 2006.

YU, D.; WANG, Z.; ZHAO, L.; CHENG, Y.; CAO, S. Resolution of 2-octanol by SBA-15 immobilized *Pseudomonas* sp. Lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 48, p. 64–69, 2007.

ZNIDARSIC-PLAZL, P.; PLAZL, I. Modelling and experimental studies on lipase-catalyzed isoamyl acetate synthesis in a microreactor. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 1115-1121, 2009.